

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA ZOOTECNIA



**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE MACRÓFAGOS
MURINOS J774A.1 CONTRA *Encephalitozoon cuniculi***

POR

M.V.Z. JESÚS RUBIN GONZÁLEZ MACHORRO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

MAYO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE MACRÓFAGOS
MURINOS J774A.1 CONTRA *Encephalitozoon cuniculi***

POR

M.V.Z. JESÚS RUBIN GONZÁLEZ MACHORRO

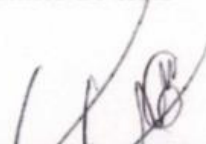
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

MAYO, 2017

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE MACRÓFAGOS MURINOS

J774A.1 CONTRA *Encephalitozoon cuniculi*

Comité de tesis



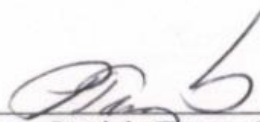
Dr. Uziel Castillo Velázquez
Presidente



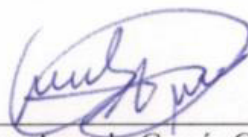
Dr. Adolfo Soto Domínguez
Secretario



Ph.D Luis Edgar Rodríguez Tovar
Vocal



Dra. Patricia Tamez Guerra
Vocal



Dra. Aracely García García
Vocal

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE MACRÓFAGOS MURINOS

J774A.1 CONTRA *Encephalitozoon cuniculi*

Dirección de tesis



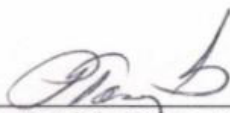
Dr. Uziel Castillo Velázquez
Director



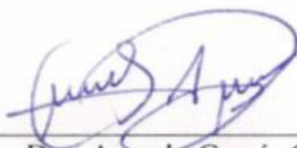
Dr. Adolfo Soto Domínguez
Director Externo



Ph.D Luis Edgar Rodríguez Tovar
Co-Director



Dra. Patricia Tamez Guerra
Director Externo



Dra. Aracely García García
Director Externo

AGRADECIMIENTOS

A mi comité de tesis: Ph.D Luis Edgar Rodríguez Tovar, Dr. Adolfo Soto Domínguez, Dra. Patricia Tamez Guerra y Dra. Aracely García García por sus comentarios, consejos y orientación para la realización de este trabajo.

A mi asesor: Uziel Castillo Velázquez. Le agradezco el que siempre estuviese presente para resolver mis dudas y corregir mis errores. Gracias por enseñarme a trabajar en un laboratorio y permitirme la libertad de tomar decisiones fundamentales en la realización de esta tesis. Sus esfuerzos siempre los valoraré, no fueron en vano, el presente trabajo y las destrezas obtenidas son prueba de ello.

A mis compañeros del laboratorio: A César, Ivonne, Heidi, Anahís, Emiliano, Alicia, Juan, Melisa, Denisse, Saraí, Lucía, Fátima, Erick y Joel. Ustedes fueron de gran ayuda en diversos puntos de esta investigación.

A mis compañeros del laboratorio de Virología: Especialmente a Lesly y Alejandro quienes siempre tuvieron la mejor disposición de ayudar ya sea con reactivos, consumibles o consejos. Les agradezco su amabilidad y cooperación.

A mis compañeros del laboratorio de Bacteriología: Especialmente a Mauricio y Sandra quienes siempre colaboraron con la esterilización de nuestros consumibles. Gracias Mauricio por tu buena disposición, se te aprecia bastante.

De la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León: Al Dr. Ramiro Ávalos Ramírez por sus consejos, enseñanzas, por permitirme trabajar en su laboratorio y con ello obtener experiencia y habilidades. Admiro su trabajo y su entrega a la medicina veterinaria.

Al Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar y a la Dra. Alicia Magdalena Nevárez Garza por confiar en mí desde un principio y darme la oportunidad de trabajar dentro del laboratorio de Inmunología. Al Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño por sus consejos, apoyo de reactivos y consumibles. Al Dr. Rogelio Ledezma por abrirme las puertas del laboratorio de Reproducción para la utilización de sus equipos.

Del Laboratorio Central Regional del Norte de México: Al M.V.Z. Gabriel de León y al Dr. Alberto Morales Loredo por su apoyo de consumibles y asesoría.

De la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León:
A la Dra. Patricia Tamez Guerra, al Dr. Ricardo Gómez Flores y al Dr. Juan Francisco Contreras Cordero por el apoyo de biológicos, consumibles y reactivos.

De la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León: Al Dr. Adolfo Soto Domínguez y al Dr. Humberto Rodríguez Rocha por su asesoría, apoyo de reactivos y consumibles.

De la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León: Al Dr. Víctor E. Aguirre Arzola quién fungió como mi tutor y siempre aportó buenos consejos a esta investigación. Se agradece el tiempo dedicado.

Al personal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo de biológicos.

DEDICATORIA

A Dios:

Gracias por darme la oportunidad de aprender en esta vida.

A mis padres:

Rosa Nelly y Jesús Rubin, por apoyarme en todo momento, ya que sin ellos no podría culminar esta etapa de mi vida. Lo que soy se lo debo a ellos, unos padres ejemplares.

A mis hermanas:

Daniela y Emily, que siempre estuvieron conmigo cuando pasé buenos y malos momentos, sé que siempre seremos los mejores hermanos.

A mi novia:

Yazmín, por demostrarme su amor con comprensión y detalles hermosos que los llevo muy presentes todo el tiempo. Te quiero mucho.

A mis amigos:

Debanhi Gerardo, Carlos Daniel y Emmanuel, por motivarme para terminar este proyecto, por los buenos momentos y el apoyo brindado.

A mi asesor:

Uziel, por confiar en mí desde un principio y motivarme a seguir adelante desde el inicio y hasta el final

A la Universidad Autónoma de Nuevo León

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1.- INTRODUCCIÓN	16
2.- REVISIÓN DE LITERATURA	18
2.1.- Agente etiológico	18
2.2.- Ciclo de vida	19
2.2.1.- Fase ambiental	19
2.2.2.- Fase proliferativa	22
2.2.3.- Fase esporogónica	22
2.3.- Epidemiología.....	23
2.3.1.- Seroprevalencia de anticuerpos contra <i>E. cuniculi</i> en conejos	23
2.3.2.- Seroprevalencia de anticuerpos contra <i>E. cuniculi</i> en humanos	23
2.3.3.- Presencia de <i>E. cuniculi</i> en humanos	24
2.4.- Respuesta inmune frente a agentes infecciosos	26
2.4.1.- Macrófagos	26
2.4.2.- El proceso fagocítico	27
2.4.3.- Producción de óxido nítrico	28
2.5.- Supervivencia intracelular	29
3.- JUSTIFICACIÓN.....	31
4.- HIPÓTESIS.....	31
5.- OBJETIVO GENERAL	31
6.- OBJETIVOS PARTICULARES	31
7.- MATERIAL Y MÉTODOS	32
7.1.- Propagación de <i>E. cuniculi</i> y cosecha de sus esporas	32
7.1.1.- Cultivo celular	32
7.1.2.- Cosecha de esporas de <i>E. cuniculi</i>	34
7.1.3.- Conteo de esporas mediante cámara de Neubauer	34
7.2.- Índice fagocítico y supervivencia intracelular.....	36
7.2.1.- Diseño experimental	36
7.2.2.- Tratamientos aplicados a esporas de <i>E. cuniculi</i>	38
7.2.3.- Cosecha y siembra de macrófagos J774.A1.....	38

7.2.4.- Activación celular mediante LPS	40
7.2.5.- Infecciones de macrófagos J774.A1.....	40
7.2.6.- Colecta de sobrenadantes y esporas intracelulares	41
7.2.7.- Microscopía óptica de alta resolución en cortes semifinos.....	41
7.2.8.- Determinación del índice fagocítico y valoración de la supervivencia intracelular	42
7.3.- Medición de óxido nítrico.....	42
7.3.1.- Preparación de una curva de referencia estándar de nitritos.....	43
7.3.2.- Determinación de óxido nítrico presente en sobrenadantes	45
7.4.- Evaluación de la viabilidad celular	45
7.4.1.- Diseño experimental	46
7.4.2.- Ensayos de viabilidad celular	47
7.5.- Análisis Estadístico	48
8.-RESULTADOS	49
8.1.- Establecimiento de <i>E. cuniculi</i> y cosecha de sus esporas.....	49
8.2.- Determinación del índice de fagocitosis de esporas de <i>E. cuniculi</i> por macrófagos murinos J774A.1	51
8.3.- Valoración de la supervivencia intracelular de <i>E. cuniculi</i> en macrófagos murinos J774A.1.....	55
8.4.- Cuantificación de la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos J774A.1 infectados con <i>E. cuniculi</i>	56
8.5.- Evaluación de la viabilidad celular de macrófagos J774A.1 expuestos a <i>E. cuniculi</i>	58
9.- DISCUSIÓN	60
10.- CONCLUSIONES	69
11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
12.- SOLUCIONES	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Primeros reportes de <i>E. cuniculi</i> en humanos	25
Tabla 2.- Modelo experimental de fagocitosis y supervivencia intracelular.....	37
Tabla 3.- Modelo experimental de ensayos de viabilidad celular	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Representación de una espora de <i>E. cuniculi</i>	20
Figura 2.- Germinación de la espora	21
Figura 3.- Reacción entre el óxido nítrico y el anión peroxinitrito.....	28
Figura 4.- Cuadrículas contempladas para el conteo de esporas	35
Figura 5.- Diseño experimental de fagocitosis y supervivencia intracelular	37
Figura 6.- Curva de calibración utilizando NaNO_2	44
Figura 7.- Curva de nitritos.....	44
Figura 8.- Diseño experimental para los ensayos de viabilidad	46
Figura 9.- Células Vero E6 en la primera semana de infección.....	49
Figura 10.- Células Vero E6 infectadas con <i>E. cuniculi</i>	50
Figura 11.- Célula Vero E6 en la tercera semana de infección	50
Figura 12.- Índice de fagocitosis de esporas de <i>E. cuniculi</i>	52
Figura 13.- Macrófagos fagocitando esporas de <i>E. cuniculi</i>	52
Figura 14.- Macrófagos expuestos a esporas de <i>E. cuniculi</i>	53
Figura 15.- Macrófagos activados y expuestos a esporas de <i>E. cuniculi</i>	53
Figura 16.- Macrófagos expuestos a esporas muertas por calor.....	54
Figura 17.- Macrófagos expuestos a esporas muertas por formalina	54
Figura 18.- Supervivencia intracelular de <i>E. cuniculi</i>	56
Figura 19.- Concentración de nitritos presente en sobrenadante.....	57
Figura 20.- Viabilidad celular de macrófagos expuestos a <i>E. cuniculi</i>	58
Figura 21.- Diferencias estadísticas en la viabilidad celular de macrófagos	59

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ATCC	American type cell collection
ATP	Adenosín trifosfato
cRPMI 1640	Medio de cultivo completo
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DEC-205	Receptores para mananas e integrinas
DO	Densidad óptica
ETS	Espaciado transcrito interno
FK	Esporas muertas por formalina
HK	Esporas muertas por calor
IFN- γ	Interferón gamma
IL-1	Interleucina uno
IL-6	Interleucina seis
IL-12	Interleucina doce
IL-18	Interleucina dieciocho
iNOS/NOS2	Óxido nítrico sintasa
J774	Macrófagos peritoneales de ratón Balb/c
KOH	Hidróxido de potasio
LPS	Lipopolisacárido
MØ	Macrófagos
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo dos
MR	Receptor para manosa
MRC5	Fibroblastos pulmonares humanos
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NED	Dihidrocloreto de N-1-naftil-etilendiamina
NK	Linfocitos asesinos naturales
NO ₂ -	Nitritos
NOD	Receptores tipo dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
ON	Óxido nítrico
P53	Proteína supresora de tumores

PBS	Buffer fosfato salino
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Post-infección
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
RIG-1	Receptores de tipo gen inducible
RLRs	Receptores de ácido retinoico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ScR	Receptores para lipopolisácaridos, Scavenger
SFBI	Suero Fetal Bovino Inactivado
SWP1	Proteína de pared tipo uno de la espora microsporidiana
TLRs	Receptores tipo toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Vero E6	Células epiteliales de riñón de mono verde
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano

RESUMEN

Encephalitozoon cuniculi actúa como parásito intracelular en macrófagos de mamíferos al ser fagocitadas sus esporas. La unión de este patógeno a receptores TLR2 en macrófagos humanos estimula la expresión de IL-12 y TNF- α que activan a linfocitos NK para que produzcan IFN- γ , citocina que confiere a los macrófagos propiedades antimicrosporidianas. Sin embargo, algunos esporoplasmas escapan de lisosomas hacia citoplasma y se desarrollan dentro de una vacuola parasitófora evadiendo así su destrucción. Este estudio evaluó el índice fagocítico de esporas de *E. cuniculi* y su supervivencia intracelular en macrófagos J774A.1 así como sus efectos sobre la producción de óxido nítrico y viabilidad celular. Se utilizaron tres tipos de esporas: 1) Intactas, 2) Muertas por calor a 90°C, y 3) Muertas por formalina al 10%. La activación de macrófagos incrementó ($P \leq 0.01$) la fagocitosis y produjo una disminución ($P \leq 0.01$) de esporas intracelulares a las 24 y 48 h, no obstante, a las 72 h los microsporidios aumentaron significativamente ($P \leq 0.001$). Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la producción de óxido nítrico entre las 3 y 72 h en los tratamientos de activación y de infección. Además, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la viabilidad celular entre las 3 y 72 h en el tratamiento de infección. Los resultados aquí mostrados indican que la activación de macrófagos J774A.1 con LPS a 50ng/ml consigue aumentar la fagocitosis, pero sus efectos son limitados y *E. cuniculi* es capaz de sobrevivir sin inducir un aumento en la producción de óxido nítrico ni comprometer la viabilidad de estos.

ABSTRACT

Encephalitozoon cuniculi acts as an intracellular parasite in macrophages as their spores are phagocytosed. Binding of this pathogen to TLR2 receptors in human macrophages stimulates the expression of IL-12 and TNF- α that activate NK lymphocytes in order to produce IFN- γ which confers to macrophages antimicrosporidian properties. However, some sporoplasms may escape from lysosomes into cytoplasm and develop into a parasitophorous vacuole evading their destruction. This study evaluated the phagocytic index of *E. cuniculi* spores and its intracellular survival on J774A.1 as well as its effects on the production of nitric oxide and cellular viability. Three types of spores were used, 1) untreated spores, 2) killed by heating (90°C), and 3) killed with 10% formalin. The activation of macrophages increased ($P \leq 0.01$) the phagocytosis and produced a decrease ($P \leq 0.01$) of intracellular spores at 24 and 48 h, however at 72 h the microsporidia increased significantly ($P \leq 0.001$). Significant differences were found ($P \leq 0.05$) in the production of nitric oxide between 3 and 72 h in the treatments of activation and infection. Also, significant differences were found ($P \leq 0.05$) in the cell viability between 3 and 72 h in the infection treatment. The results here shown indicate that the activation with LPS at 50ng/ml increases ($P \leq 0.01$) phagocytosis, but their effects are limited and *E. cuniculi* can survive without inducing an increase in the production of nitric oxide neither compromising the macrophage viability.

1.- INTRODUCCIÓN

Encephalitozoon cuniculi, inicialmente descubierto en 1922 (Wright & Craighead, 1992) y posteriormente nombrado en 1923 por Levaditi *et al.* (1923); es un microorganismo perteneciente al filo Microsporidia (Mathis, 2000), que se ha asociado filogenéticamente al reino Fungi (Keeling, 2003). Utiliza la producción de esporas para infectar a una amplia gama de vertebrados incluidas algunas aves y mamíferos como animales domésticos y el hombre, siendo el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) su principal reservorio. Produce en este último la encefalitozoonosis, una enfermedad que compromete al sistema nervioso central, al hígado, riñón y ojo (Künzel *et al.*, 2008). A menudo se presentan en estos animales una meningoencefalitis granulomatosa que produce trastornos de tipo vestibular y movimientos en círculos; y una nefritis intersticial que termina evidenciándose por una incontinencia urinaria por rebosamiento (Harcourt-Brown, 2004). Los individuos afectados comienzan a diseminar esporas infectivas de *E. cuniculi* a través de heces y orina, mismas que pueden ser ingeridas por otros animales los cuales podrían contraer la enfermedad dependiendo de su estado inmunológico, ya que estos agentes infecciosos presentan un comportamiento oportunista (Valencakova & Halanova, 2012). Se tiene el conocimiento de que estos microorganismos son capaces de infectar células epiteliales, endoteliales, musculares cardíacas, fibroblastos pulmonares y macrófagos (Visvesvara, 2002) mediante la germinación de sus esporas al inyectar su esporoplasma o a través de la fagocitosis de las mismas (Couzinet *et al.*, 2000). Dentro de las células infectadas comienza un proceso replicativo que a menudo evade los procesos internos de control de infecciones y que tiene como fin la producción de un gran número de esporas para ser liberadas al espacio extracelular (Weidner, 1975).

Se ha evidenciado en promedio y a lo largo del planeta una seroprevalencia en conejos del 50% la cual es bastante alta. Esto pudiera explicar el que se hayan encontrado en humanos clínicamente sanos seroprevalencias de entre 5 y 10% (Halánová *et al.*, 2002; Yaoqian *et al.*, 2015) las cuales son indicativo de exposición a un agente potencialmente zoonótico. Se ha encontrado además una relación positiva entre la presencia de anticuerpos contra *E. cuniculi* e infecciones persistentes en pacientes inmunocomprometidos (Abu-Akkada *et al.*, 2015; Adam *et al.*, 2014).

Recientemente se ha reportado la presencia de estos microorganismos en casos de trasplantes de órganos, donde los tratamientos inmunosupresores que reciben los aceptores de órganos, crean las condiciones idóneas para que se desarrolle la infección.

Este estudio permitió entender la medida en que *E. cuniculi* es internalizado en células activadas o no activadas del sistema fagocítico mononuclear cuando sus esporas son expuestas previamente a tres distintos tratamientos: 1) Esporas intactas, 2) Sometidas a una temperatura de 90°C, y 3) Sumergidas en formalina tamponada al 10%. Se evaluó la supervivencia de estos microorganismos dentro de células activadas y no activadas. Asimismo, se buscó cuantificar la presencia de óxido nítrico en sobrenadantes de células estimuladas con LPS y/o infectadas con *E. cuniculi* para asociarlo con activación celular. De igual forma, se cuantificó mediante espectrofotometría la formación de cristales de formazán por parte de células activadas con LPS y/o infectadas con *E. cuniculi* y expuestas a la sal de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y los resultados se asociaron a viabilidad celular.

2.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.- Agente etiológico

E. cuniculi es un microorganismo unicelular de tipo eucariota que funge como parásito intracelular obligado para completar su ciclo de vida (Cali & Takvorian, 1999; Weiss & Vossbrinck, 1999). Es capaz de infectar células epiteliales, endoteliales, musculares cardíacas, fibroblastos pulmonares y células del sistema fagocítico mononuclear (concretamente macrófagos) (Visvesvara, 2002). Para llevar a cabo lo anterior, cuenta con dos mecanismos de internalización: uno de ellos es la invasión activa mediante la germinación de sus esporas e inoculación de su material infectante en una célula apropiada; o invasión pasiva a través de procesos fagocíticos sobre las mismas (Couzinet *et al.*, 2000).

Posee un pequeño genoma de apenas 2.9mb (Biderre *et al.*, 1995) en el cual se encuentran codificados remanentes mitocondriales conocidos como mitosomas (Vávra, 2005; Williams *et al.*, 2002). *E. cuniculi* no posee ciertas rutas metabólicas como fosforilación oxidativa, cadena transportadora de electrones y ciclo del ácido tricarboxílico, sin embargo cuenta con la ruta de las pentosas fosfato, la glucólisis y el metabolismo de la trehalosa (Katinka *et al.*, 2001) .

Se han descrito tres cepas distintas de *E. cuniculi* en base al número de repeticiones de GTTT en el espaciado transcrito interno (ETS) del gen del rDNA. De este modo se conoce un genotipo I (“cepa de conejo”) con tres repeticiones, genotipo II (“cepa de ratón”) con dos repeticiones y genotipo III (“cepa de perro”) con cuatro repeticiones (Didier *et al.*, 1995).

Sus ribosomas no cuentan con la subunidad 5.8 del rRNA, misma que es característica de células eucariotas; en cambio tiene una sola subunidad grande la cual es típica de células procariotas (Vossbrinck & Woese, 1986). Carece de peroxisomas y aparato de Golgi; sin embargo posee una estructura conocida como polaroplasto la cual se piensa que tiene funciones similares a las de este último (Corradi & Keeling, 2009).

2.2.- Ciclo de vida

El ciclo de vida de *E. cuniculi* se ha dividido en tres fases generales: 1) Fase ambiental, 2) Fase proliferativa y 3) Fase esporogónica (Cali & Takvorian, 1999).

2.2.1.- Fase ambiental

Las esporas de *E. cuniculi* suelen medir de 2.5 a 3µm de largo por 1.5 a 2.0µm de ancho (Didier *et al.*, 1998) y se encuentran delimitadas por una gruesa pared que está compuesta por dos capas: una capa delgada externa denominada exospora la cual es electro densa y está conformada por glicoproteínas; y una capa intermedia gruesa electro lúcida conformada de proteínas complejas y α -quitina; posteriormente se encuentra una membrana plasmática interna que delimita al esporoplasma (Vávra, 1976) donde se aloja un núcleo, numerosos ribosomas, así como las estructuras que conforman a su complejo sistema de infección que son: 1) Un largo filamento polar (túbulo polar o túbulo eyector), el cual se haya enrollado en espiral formando cinco vueltas en promedio y anclado en la porción apical de la espora mediante su disco de anclaje característico (Thelohan, 1894); 2) Un polaroplasto el cual es un conjunto de compartimentos membranosos que asemejan láminas o sacos y se encuentran en la mitad anterior de la espora; y 3) Una vacuola posterior localizada cerca del polo posterior (Leitch *et al.*, 1993; Weiss & Becnel, 2014). En la figura 1 se ejemplifica la estructura de una espora de *E. cuniculi*.

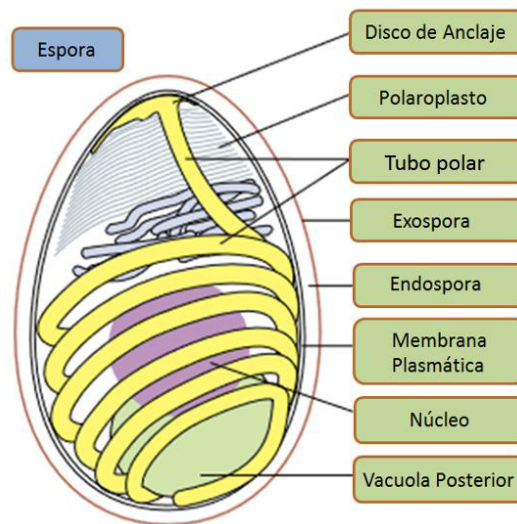


Figura 1. Representación de una espora de *E. cuniculi*. Se destacan una exospora (café), una endospora (blanco), su complejo aparato de extrusión (amarillo), un núcleo (morado), una vacuola posterior (verde) y un polaroplasto (azul) (Franzen, 2004).

A nivel intestinal, la espora microsporidiana debe de ser primeramente activada bajo cierto estímulo o estímulos que aún no se dilucidan por completo. Sin embargo, se han llevado a cabo ensayos experimentales en los que se ha inducido la germinación de las esporas bajo las siguientes condiciones: 1) Ambientes extremos de pH (Muy ácidos, alcalinos o cambios drásticos de los mismos) y 2) Alteraciones en las concentraciones de aniones y cationes (Williams, 2009). Actualmente es aceptado que la germinación de las esporas conlleva procesos de osmosis, los cuales posiblemente sean dependientes de calcio (Weidner & Byrd, 1982). Del mismo modo, también pudieran estar involucradas moléculas ionóforas y/o acuaporinas de membrana las cuales se cree que participan en el aumento en la presión osmótica que finalmente desencadena la turgencia intracelular (Dall, 1983; Frixione *et al.*, 1997). Esto ocasiona que se produzcan a su vez hinchazones en el polaroplasto y la vacuola posterior las cuales son indispensables para la germinación de las esporas (Keohane & Weiss, 1999; Lom & Vavra, 1963; Ohshima, 1937).

La germinación puede ser un proceso dependiente de energía, aunque aún no se conocen a ciencia cierta las fuentes de la misma. Se llegó a postular la posibilidad de que esta proviniese a partir de la hidrólisis de la trehalosa que contienen dentro las esporas (Undeen, 1990), sin embargo estudios posteriores determinaron que los

niveles de esta molécula disminuían durante la germinación solamente en microsporidios acuáticos mas no en terrestres por lo que se requieren actualmente estudios complementarios (Undeen & Vander Meer, 1999). Se ha inferido que la trehalosa contribuye más bien como una fuente energética de supervivencia y como un agente desecante (Méténier & Vivarès, 2001).

La germinación es inminente cuando la pared de la espora comienza a protruir sobre su porción apical e inmediatamente el túbulo polar es evertido explosivamente a gran velocidad. Mientras esto ocurre, la vacuola posterior continúa expandiéndose e induce al esporoplasma a avanzar a través del túbulo eyector. La punta del túbulo polar avanza hasta conseguir introducir el esporoplasma en el citoplasma de una célula hospedadora. Al cabo de dos segundos el proceso de germinación e inoculación habrá culminado y el esporoplasma se encontrará ahora dentro de una naciente vacuola parasitófora la cual posee poros mediante los cuales se permitirá la libre difusión de pequeñas moléculas como ATP, carbohidratos, aminoácidos y péptidos que ayudarán al microsporidio a obtener energía para completar su ciclo vital (Frixione *et al.*, 1992; Ishihara, 1968; Rönnebauer *et al.*, 2008). El proceso de germinación se resume en la figura 2.

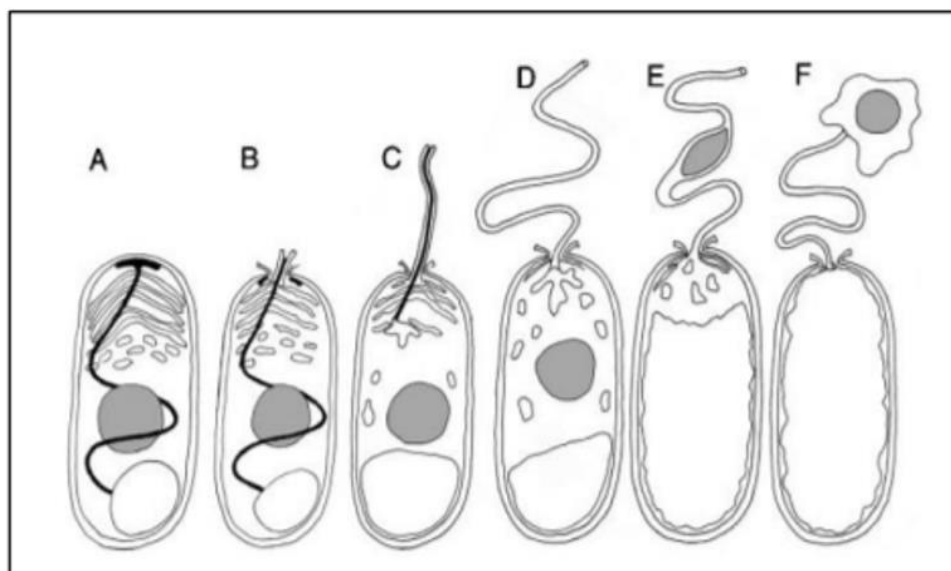


Figura 2. Germinación de la espora. **A)** Espora en reposo presentando el filamento polar (negro), su polaroplasto (gris), el núcleo (gris), su polaroplasto en la porción apical y su vacuola parasitófora en la porción distal. **B)** Hinchazón del polaroplasto y vacuola posterior, ruptura del disco de anclaje y eversión del túbulo polar sobre sí mismo. **C)** El túbulo polar continúa evertiéndose. **D)** y **E)** Una vez que el túbulo polar se encuentra completamente evertido, el esporoplasma es forzado a avanzar a través de este. **F)** El esporoplasma emerge desde el túbulo polar y ahora se encuentra delimitado por una nueva membrana (Keeling & Fast, 2002).

2.2.2.- Fase proliferativa

El esporoplasma entrará a la fase proliferativa o merogonia en la cual se producirán mediante fisiones binarias unas estructuras conocidas como merontes, los cuales estarán íntimamente adheridos a la membrana de la vacuola parasitófora (Desportes-Livage, 2000; Fasshauer *et al.*, 2005). Estas estructuras se caracterizan por poseer una morfología circular, superficies membranosas irregulares, retículo endoplásmico liso y rugoso pobremente desarrollados y pocos ribosomas (Cali & Takvorian, 1999; Didier *et al.*, 1998).

2.2.3.- Fase esporogónica

También es conocida como fase de diferenciación debido a que aquí se distinguen tres estadios: 1) Esporonte (célula que produce dos esporoblastos) 2) Esporoblasto (célula que mediante metamorfosis termina produciendo una espora) y 3) Espora madura e infectiva (Cali & Takvorian, 1999).

Los esporoblastos son células resultantes de la última división de los esporontes y es en esta etapa donde se termina de desarrollar el aparato de extrusión con todas las estructuras que lo componen (túbulo polar, disco de anclaje, polaroplasto y vacuola posterior) además de producirse una gran cantidad de ribosomas. A medida que continúa el desarrollo, los esporoblastos comienzan a crenarse, se vuelven más compactos y electrodensos para finalmente convertirse en esporas infectivas que serán liberadas al espacio extracelular cuando la célula termine por ser lisada (Cali & Takvorian, 1999). Estas esporas pueden infectar a otras células y/o ser fagocitadas por macrófagos locales o circulantes, evadir su eliminación, permanecer replicándose dentro de estas células y ser diseminadas vía circulación sistémica primero hacia ganglios linfáticos y más tarde hacia sistema nervioso central, riñón e hígado principalmente (Meredith & Richardson, 2015).

Conejos inoculados experimentalmente eliminan grandes cantidades de esporas mediante orina entre la quinta y sexta semana posterior a la exposición (Cox *et al.*, 1979; Jeklova *et al.*, 2010); pudiendo estas sobrevivir durante meses en condiciones de ambiente húmedo y a una temperatura de entre 10 y 30°C (Waller, 1979). Este

largo período de supervivencia le confiere a *E. cuniculi* la capacidad de transmitirse vía horizontal mediante inhalación y/o ingesta de sus esporas contenidas en agua o alimentos contaminados; o vía vertical a través de infección transplacentaria, aunque esta última forma de infección solo se ha descrito en conejos (Meredith & Richardson, 2015).

2.3.- Epidemiología

A través de pruebas serológicas se ha determinado que conejos de criaderos y tiendas de mascotas conviven a menudo con *E. cuniculi* y que existe una alta prevalencia de anticuerpos contra este agente infeccioso en humanos inmunocompetentes y clínicamente sanos.

2.3.1.- Seroprevalencia de anticuerpos contra *E. cuniculi* en conejos

E. cuniculi se encuentra ampliamente diseminado entre poblaciones de conejos de acuerdo a resultados de diversos estudios seroepidemiológicos llevados a cabo en diferentes países del mundo. Por ejemplo: Se han reportado seroprevalencias del 15% en Egipto, 81.7% en Brasil, 61.1% en Estados Unidos, 63.5% en Japón, 70.5% en Austria, 16.5% en Nigeria, 31.6% en Italia y 67.8% en Taiwán; obteniendo con estos datos en promedio una prevalencia global del 50.96% (Ashmawy *et al.*, 2011; Baldotto *et al.*, 2015; Cray *et al.*, 2009; Igarashi *et al.*, 2008; Künzelt *et al.*, 2008; Okewole, 2008; Santaniello *et al.*, 2009; Tee *et al.*, 2011).

2.3.2.- Seroprevalencia de anticuerpos contra *E. cuniculi* en humanos

Se ha documentado la presencia de anticuerpos contra estos agentes infecciosos en un 5 y 10% en personas inmunocompetentes que no mostraban signos clínicos aparentes (Halánová *et al.*, 2002; Yaoqian *et al.*, 2015) y se ha encontrado además una relación positiva entre la presencia de anticuerpos contra *E. cuniculi* y pacientes inmunocomprometidos o con infecciones virales como VIH o VPH (Abu-Akkada *et al.*, 2015; Adam *et al.*, 2014).

2.3.3.- Presencia de *E. cuniculi* en humanos

En 1959 se presentó el primer caso de encefalitozoonosis en un ser humano, este provino de un niño japonés de 9 años el cual presentaba fiebre de 39°C, dolores de cabeza, vómitos, pérdida de la consciencia y convulsiones (Matsubayashi, 1959). A partir de esta fecha se llegaron a reportar algunos casos pero sin mayor trascendencia y fue a partir de los 90's cuando se dieron los primeros reportes bien documentados en pacientes inmunocomprometidos que presentaban trastornos neurológicos y desórdenes nefrológicos (Weber *et al.*, 1994). En la tabla 1 se resumen algunos casos de pacientes inmunocomprometidos que contrajeron la enfermedad en la década de los 90's:

Primeros reportes de <i>E. cuniculi</i> en humanos inmunocomprometidos		
País	Diagnóstico	Referencia
Estados Unidos	Cultivo celular y PCR	(De Groote <i>et al.</i>, 1995)
Alemania	Anticuerpos inmunofluorescentes y Microscopía electrónica de transmisión	(Franzen <i>et al.</i>, 1995)
Estados Unidos	PCR	(Didier <i>et al.</i>, 1996)
Estados Unidos	Anticuerpos inmunofluorescentes y técnicas moleculares	(Mertens <i>et al.</i>, 1997)
Suiza	Cultivo celular y PCR	(Weber <i>et al.</i>, 1997)
Italia	Inmunoblot y PCR	(Rossi <i>et al.</i>, 1998)
España	Cultivo celular y PCR	(Del Aguila <i>et al.</i>, 2001)
Italia	Microscopía electrónica y PCR	(Tosoni <i>et al.</i>, 2002)

Tabla 1. Primeros reportes sobre la presencia de *E. cuniculi* en pacientes inmunocomprometidos. A través de diagnósticos moleculares y de aislamiento microsporidiano en cultivo celular se ha podido corroborar la presencia de este agente en infecciones oportunistas.

Recientemente se ha descrito la infección en casos de trasplantes de órganos como el reporte de una mujer de 45 años libre de VIH y que recibió un tratamiento inmunosupresor debido a un trasplante renal. Esta persona se encontraba diseminando esporas a través de heces, orina y finalmente murió (Mohindra *et al.*, 2002). O el de una mujer de 49 años que recibió un trasplante de células madre para tratar un linfoma de Hodgkin y tiempo después presentaba esporas de *E. cuniculi* en alvéolos bronquiales, sangre, heces y orina; además se suministró un tratamiento por tres semanas que no consiguió erradicar la infección, muriendo 8 meses después (Ambrosioni *et al.*, 2010). Se reportó además el caso de dos niñas de 13 años que, al recibir riñones de un paciente fallecido por etiología desconocida, comenzaron a experimentar fiebres y problemas nefrológicos que no cedían a tratamientos antimicrobianos convencionales. La biopsia renal reveló esporas de *E. cuniculi* e

inmediatamente se suspendió el tratamiento inmunosupresor que venían recibiendo y se inició un tratamiento con albendazol consiguiendo la mejoría de ambas pacientes (Ladapo *et al.*, 2014).

2.4.- Respuesta inmune frente a agentes infecciosos

La primera línea de defensa contra agentes infecciosos en mamíferos está representada por los neutrófilos, células de respuesta inmune innata que, si bien acuden rápidamente a controlar la infección, su capacidad para eliminarla no es muy eficiente. Es por esto que se recluta a células fagocíticas especializadas que pueden encontrarse en circulación sistémica como monocitos inmaduros; o en una gran cantidad de tejidos y órganos como macrófagos (Tizard, 2013).

2.4.1.- Macrófagos

Estas células cuentan con una respuesta lenta pero cumplen muchas funciones dentro de las que se destacan: Actuar como células centinela, ser capaces de eliminar por si solas ciertas infecciones, reparar tejidos dañados e iniciar una respuesta inmune adaptativa mediante presentación de antígenos y secreción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (Tizard, 2013).

Se dice que actúan como células centinela debido a que expresan en su superficie receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como los receptores tipo toll (TLRs), receptores de ácido retinoico (RLRs), y receptores de unión a nucleótidos (NLRs) los cuales activan cascadas de señalización intracelular en presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que a su vez inducirán a la producción de citocinas pro inflamatorias como son IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que reclutarán células y contribuirán a llevar a cabo una respuesta inmune adaptativa (Tizard, 2013).

2.4.2.- El proceso fagocítico

Las células tienen normalmente la capacidad de ingerir partículas, pero solo los neutrófilos y los macrófagos lo hacen de manera profesional (Rojas *et al.*, 2003).

Cuando se suscita una infección microbiana, ciertas moléculas como productos bacterianos, componentes del complemento y los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) de células y tejidos afectados funcionan como quimioatrayentes para monocitos los cuales se adhieren a endotelio vascular para emigrar posteriormente a los tejidos en los que se encuentre la infección donde finalmente se produce la fagocitosis, un proceso endocítico que ocurre a través de la unión de patógenos extracelulares con receptores localizados en la membrana celular de macrófagos (Abbas *et al.*, 2014).

La ingestión de microorganismos ocurre a través de dos tipos de receptores: los receptores para constituyentes propios de los microorganismos, los PRRs; y los receptores para opsoninas. Los primeros incluyen a los receptores para manosa (MR), los receptores para mananos e integrinas (DEC-205), y los receptores para lipopolisácaridos (ScR, Receptores Scavenger) (Medzhitov & Janeway Jr, 2000). La membrana plasmática se extiende alrededor del microorganismo a fagocitar una vez que este se une a los receptores de membrana específicos. Posteriormente el agente es internalizado en una vesícula membranal conocida como fagosoma, la cual se fusiona con un lisosoma para formar un fagolisosoma. Los receptores que contribuyeron a la internalización del microorganismo a su vez desencadenan una serie de señales que activan a tres principales enzimas dentro de este fagolisosoma (Medzhitov & Janeway Jr, 2000):

- 1) La fagocito oxidasa que convierte el oxígeno molecular en anión súper óxido y radicales libres. Estas sustancias son conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS) y son tóxicas para patógenos ingeridos
- 2) La óxido nítrico sintasa que cataliza la conversión de arginina a óxido nítrico (ON), una sustancia con propiedades microbicidas
- 3) Proteasas lisosomales que rompen proteínas microbianas para presentar sus péptidos como antígenos

2.4.3.- Producción de óxido nítrico

En algunos mamíferos como roedores, bovinos, ovinos y equinos los PAMPs microbianos estimulan a los macrófagos para que estos sinteticen a la óxido nítrico sintasa (iNOS o NOS2), enzima que actúa sobre la L-arginina usando NADPH y oxígeno para producir grandes cantidades de ON y citrulina (Tizard, 2013). Por si solo el ON no es muy tóxico pero reaccionando con el anión de superóxido se producen potentes oxidantes como peroxinitrito y radicales de dióxido de nitrógeno (Tizard, 2013). La reacción se resume en la figura 3.

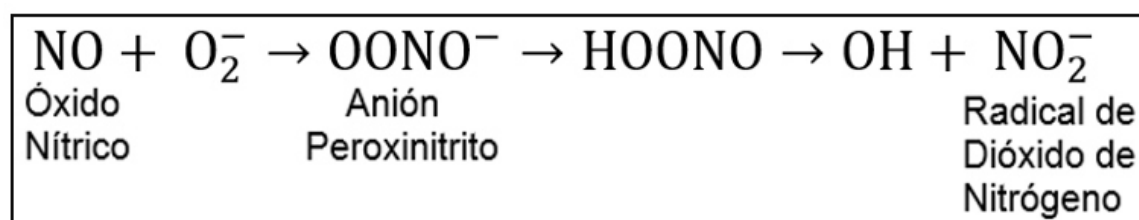


Figura 3. Reacción entre el óxido nítrico y el anión peroxinitrito. Se producen radicales de dióxido de nitrógeno, potentes componentes microbicidas (Tizard, 2013).

Al ingerir microorganismos los macrófagos producen IL-12 y TNF- α , citocinas que estimulan a cierto tipo de linfocitos conocidos como asesinos naturales (“NK”) para que secreten IFN- γ , citocina pro-inflamatoria que actúa directamente sobre los macrófagos, “activándolos”, y ocasionando un aumento en la transcripción del gen de la enzima iNOS para convertir a los macrófagos en eficaces asesinos de patógenos intracelulares (Abbas *et al.*, 2014; Tizard, 2013).

Los proteínas de los microorganismos entran en contacto con enzimas proteolíticas y se generan muchos péptidos de variable longitud y secuencia los cuales pueden ser presentados mediante moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) (Abbas *et al.*, 2014; Medzhitov & Janeway Jr, 2000) a linfocitos que generarán una respuesta inmune adaptativa a través de la producción de anticuerpos dirigidos hacia el agente en cuestión.

2.5.- Supervivencia intracelular

El mecanismo de control intracelular por parte de macrófagos funciona contra una gran parte de agentes infecciosos. Sin embargo algunos microorganismos como los protozoarios *Leishmania*, *Cryptosporidium spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii* y el microsporidio *E. cuniculi* pueden evitar su destrucción por parte del sistema inmune (Valencakova & Halanova, 2012).

Como se mencionó anteriormente, *E. cuniculi* consigue internalizarse en las células que infecta mediante la germinación de sus esporas y a través de la ingesta de las mismas (Couzinet *et al.*, 2000). Los estudios de Franzen *et al.* (2005). indican que las esporas son internalizadas en mayor proporción a través de ingesta fagocítica y sugieren que estas logran evadir su destrucción en los fagolisosomas mediante la germinación dirigida hacia el citoplasma de la célula hospedadora.

Bajo este planteamiento, el esporoplasma comenzaría a replicarse dentro de una vacuola parasitófora que evitaría la fusión con endosomas/lisosomas (Weidner, 1975) y estas células se convertirían en “caballos de Troya” con un alto potencial para diseminar la infección hacia diversos órganos y terminarían muriendo por lisis celular cuando la carga microsporidiana fuese demasiado alta.

Las células poseen además un mecanismo dependiente de ATP conocido como apoptosis (Kerr *et al.*, 1972), en el cual la célula infectada entra en un proceso de muerte celular programada formando cuerpos apoptóticos para ser fagocitada fácilmente por otras células fagocíticas profesionales, evitando así libre dispersión del agente infeccioso hacia el espacio extracelular (MacFarlane & Williams, 2004). Algunos protozoarios como *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.*, *Cryptosporidium parvum* y el microsporidio *Nosema algerae* interfieren con la señalización intracelular normal de las células, provocando una inhibición en el proceso apoptótico de las mismas (Heussler *et al.*, 2001).

Recientemente se comprobó que en células Vero E6 infectadas con *E. cuniculi*, el producto de la escisión de la caspasa-3, una proteína intermediaria en el proceso apoptótico, se encuentra ausente a diferentes tiempos. Se ha sugerido además que la replicación del parásito no activa la vía de apoptosis o es capaz de bloquear la cascada señalización en estas células ya que p53, un factor supresor de tumores que

funge como factor transcripcional clave en este proceso, no se encuentra en su forma fosforilada ni es translocado al núcleo cuando ocurre la infección. Asimismo, se ha observado que al aplicar Estaurosporina, un agente natural inductor de apoptosis, sobre cultivos previamente infectados, se aprecia una inhibición parcial en la translocación de p53 y consecuentemente una inhibición de muerte celular programada (Del Aguila *et al.*, 2006). Por lo anterior, no sería descabellado pensar que *E. cuniculi* así como *N. algerae* (Leech *et al.*, 1999) fuese capaz de inhibir cascadas de señalización apoptótica en células que infecta como macrófagos peritoneales, consiguiendo así replicarse en gran número sin ser eliminado eficientemente.

3.- JUSTIFICACIÓN

La encefalitozoonosis representa a una enfermedad emergente con alto potencial zoonótico, poco estudiada y comprendida. El presente estudio buscará dilucidar en qué medida las células de defensa del hospedador pudieran hacer frente a una infección de esta naturaleza y sentará las bases para estudios posteriores.

4.- HIPÓTESIS

La activación de macrófagos J774A.1 mediante LPS conferirá capacidad antimicrosporidiana sobre *E. cuniculi* en un modelo *in vitro*.

5.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la viabilidad de esporas *E. cuniculi* sobre la actividad antimicrosporidiana de macrófagos murinos activados y no activados.

6.- OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer una línea de cultivo celular para propagar *E.cuniculi* y cosechar sus esporas para infección
2. Determinar el índice de fagocitosis de esporas de *E. cuniculi*: intactas, muertas por calor y formalina en macrófagos murinos J774A.1
3. Valorar la supervivencia intracelular de *E. cuniculi* en macrófagos murinos J774A.1
4. Cuantificar la producción de ON en macrófagos murinos J774A.1 infectados con *E. cuniculi*
5. Evaluar la viabilidad celular de macrófagos murinos J774A.1 desafiados con *E. cuniculi*

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

7.1.- Propagación de *E. cuniculi* y cosecha de sus esporas

Para llevar a cabo el proceso experimental, era necesario producir en poco tiempo una gran cantidad de microorganismos de *E. cuniculi*; debido a esto, se optó por utilizar la línea celular Vero E6 (ATCC[®]CCL-81^{MR}) como sustrato para propagación debido a que se ha demostrado que la velocidad de replicación de *E. cuniculi* es mayor en estas células (Joseph & Sharma, 2009). Esta línea fue amablemente donada por el Dr. Francisco Contreras de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

7.1.1.- Cultivo celular

Las células fueron sembradas en cajas de cultivo celular ventiladas de 25cm² (Corning, Nueva York, EUA), utilizando para su mantenimiento medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA) suplementado con suero fetal bovino inactivado (Corning, Nueva York, EUA) al 5%; y con una combinación comercial de antibióticos y antimicótico (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA) para prevenir contaminación bacteriana y/o fúngica que comprometiese el proyecto, denominando a esta mezcla cRPMI 1640. Las células fueron incubadas a una temperatura de 37°C, con inyección permanente de CO₂ al 5% y con una humedad del 95% en una incubadora Forma Series II Water Jacket (Thermo Fisher, Ohio, EUA) siguiendo la metodología descrita previamente (Del Aguila *et al.*, 2001).

Se obtuvo la cepa de laboratorio de *E. cuniculi* (ATCC[®]50789^{MR}) de la American Type Cell Collection (ATCC). Una vez que fue descongelado el criovial en el cual se entregó el biológico, fue tomada una alícuota de 250µl (6.0×10^7 microorganismos), para ser inoculada en una caja de cultivo celular de 25cm² en la que se encontraba en desarrollo una monocapa de células Vero E6 de confluencia apropiada (55-60%).

El medio de cultivo fue cambiado cada tercer día y cuando se requirieron pases celulares estos se llevaron a cabo mediante la utilización de tripsina (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) al 0.25% de acuerdo a instrucciones de ATCC[®]. Se tomaron

muestras del medio de cultivo utilizado y se observó que a la primera semana post-infección (PI) el número de esporas en sobrenadante disminuyó drásticamente. Para la segunda semana PI comenzaron a observarse células distendidas conteniendo en su interior vacuolas parasitóforas donde los microorganismos se encontraban replicándose.

Para corroborar la infección de las células Vero E6, estas fueron removidas de sus respectivas cajas de cultivo celular mediante la utilización de tripsina al 0.25%. Una vez obtenida la suspensión celular, esta fue sembrada en laminillas portaobjetos las cuales se encontraban dentro de cajas de Petri desechables y estériles. Para esto, fueron depositados 20µl de la suspensión celular sobre estas laminillas y se incubaron en la incubadora Forma Series II Water Jacket durante 30 min con la finalidad de que se adhirieran las células. Transcurridos los 30 min, el 100% de la superficie interna de la caja de Petri fue cubierta con medio de cultivo cRPMI 1640 de modo que las laminillas quedaron sumergidos en su totalidad.

Al día siguiente las laminillas fueron lavadas con PBS y sometidas a fijación mediante su inmersión en una solución que contenía partes iguales de Metanol y Acetona. El proceso se llevó a cabo en el transcurso de 20 min y a 4°C.

Los siguientes pasos se llevaron a cabo en completa oscuridad e incluyeron: La tinción de las laminillas durante 20 min con Calcoflúor White dentro de una cámara húmeda, enjuague con agua destilada, secado y finalmente el montaje de las mismas con resina y su posterior conservación para ser observadas al día siguiente en un microscopio de Epifluorescencia Axiostar Plus (Carl Zeiss, Gotinga, Alemania).

7.1.2.- Cosecha de esporas de *E. cuniculi*

Fue hasta la cuarta semana PI y cuando visualmente se apreciaban vacuolas parasitóforas en prácticamente el 80% de las células Vero E6 totales contenidas en una caja de 25cm², cuando se procedió a cosechar las esporas.

Las cajas seleccionadas para cosecha fueron raspadas en su totalidad usando un Scraper celular (Corning, Nueva York, EUA) y la suspensión fue transferida a un tubo Falcon[®] fondo cónico de 50ml (Axygen Scientific, Nueva York, EUA) para su centrifugación a 1,500 x g durante 10 min a una temperatura de 4°C en una centrifuga Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Alemania). Posteriormente el sobrenadante fue removido mediante decantación cuidando que no se perdiera la pastilla en el fondo para luego resuspenderla en 1ml de medio de cultivo cRPMI 1640. La suspensión celular resultante fue pasada a través de una aguja de calibre 27mm (Terumo, Tokio, Japón) hacia un tubo de microcentrífuga (Eppendorf, Nueva York, EUA). Se homogenizó esta suspensión en un Vórtex Mixer (Labnet, Nueva Jersey, EUA) y se repitió el proceso tomando el contenido con una nueva aguja calibre 27mm y haciendo pasar el contenido a través de ella para ser depositado finalmente en un tubo de 50ml al que se le agregaron 9ml de medio cRPMI 1640 para tener un volumen final de 10ml. Se centrifugó una última vez con las mismas condiciones para con esto eliminar la mayor parte de restos celulares al remover el sobrenadante. La pastilla fue finalmente resuspendida en 10ml de medio de cultivo cRPMI 1640.

7.1.3.- Conteo de esporas mediante cámara de Neubauer

La solución de 10ml se homogenizó apropiadamente y 10µl fueron tomados y colocados en un tubo de microcentrífuga de 0.5ml (Eppendorf, Nueva York, EUA). A estos 10µl se les agregaron 190µl de medio de cultivo cRPMI 1640 para obtener un volumen final de 200µl, posteriormente se homogenizó mediante Vórtex Mixer para que de esta manera la muestra fuese diluida 20 veces y así facilitar el conteo. A partir de esta solución se tomaron 10µl para ser depositados en cada una de las cámaras de una cámara de Neubauer (Hausser Scientific, Pensilvania, EUA). Se colocó un cubreobjetos encima de la cámara y los 10µl se depositaron en el extremo

del cubreobjetos para que el contenido avanzara por medio de capilaridad a través de la cuadrícula.

Para el conteo de esporas se utilizó un microscopio Axiostar Plus (Carl Zeiss, Gotinga, Alemania) y se analizaron las cuadrículas centrales con un aumento de 100x. Para la estimación del número de esporas totales se siguió la metodología de Fuentes (2013). En la figura 4 se muestran las secciones de la cuadrícula que se contemplaron para el conteo.

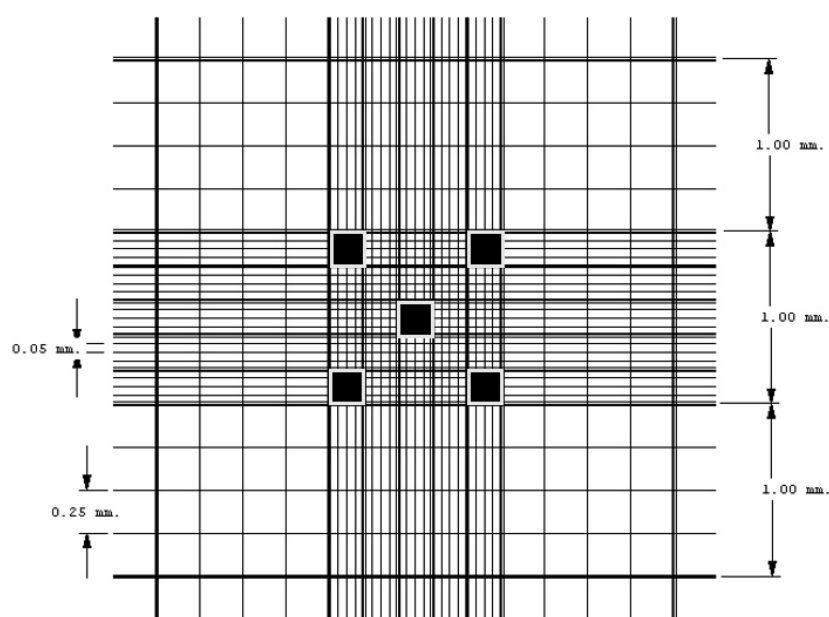


Figura 4. Cuadrículas contempladas para conteo de esporas. Se utilizaron 4 esquinas y un central de las cuadrículas centrales utilizadas comúnmente para conteo de eritrocitos.

La fórmula aplicada para la determinación del número de microorganismos es la siguiente:

$$\# \text{de esporas} = (\bar{X} \text{ de esporas de 5 cuadros centrales}) \times (0.25) \times (FD) \times (1,000,000)$$

Dónde \bar{X} representa el promedio obtenido de contabilizar y promediar a los cinco cuadros seleccionados; y FD representa el factor de dilución, que se determina de la siguiente manera:

$$FD = \frac{VF}{VI}$$

Donde VF representa el volumen final de la muestra y VI representa el volumen inicial

De este modo, el factor de dilución utilizado como estándar en los conteos de esporas fue de “20”. La solución “stock” con esporas se conservaba en refrigeración a 4°C hasta su uso.

7.2.- Índice fagocítico y supervivencia intracelular

Se analizó el índice fagocítico de esporas intactas y esporas afectadas por dos tratamientos: 1) Muertas por calor a una temperatura de 90°C y 2) Muertas por formalina tamponada al 10%, ambos tratamientos aplicados durante 30 min. La supervivencia intracelular fue determinada a las 24, 48 y 72 h y únicamente utilizando esporas intactas. Tanto el índice fagocítico como la supervivencia intracelular involucraron células J774A.1 relajadas y activadas con LPS a una concentración de 50ng/ml.

7.2.1.- Diseño experimental

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en tres repeticiones independientes. La microplaca se dividió en 4 tiempos (T0: 3 h, T1: 24 h, T2: 48 h, T3: 72 h) como se aprecia en la figura 5. Dentro del tiempo 0 (fagocitosis) se utilizaron esporas intactas, muertas por calor y formalina; y para los tiempos 1, 2 y 3 (supervivencia intracelular) se utilizaron únicamente esporas intactas. El modelo experimental se resume en la tabla 2.

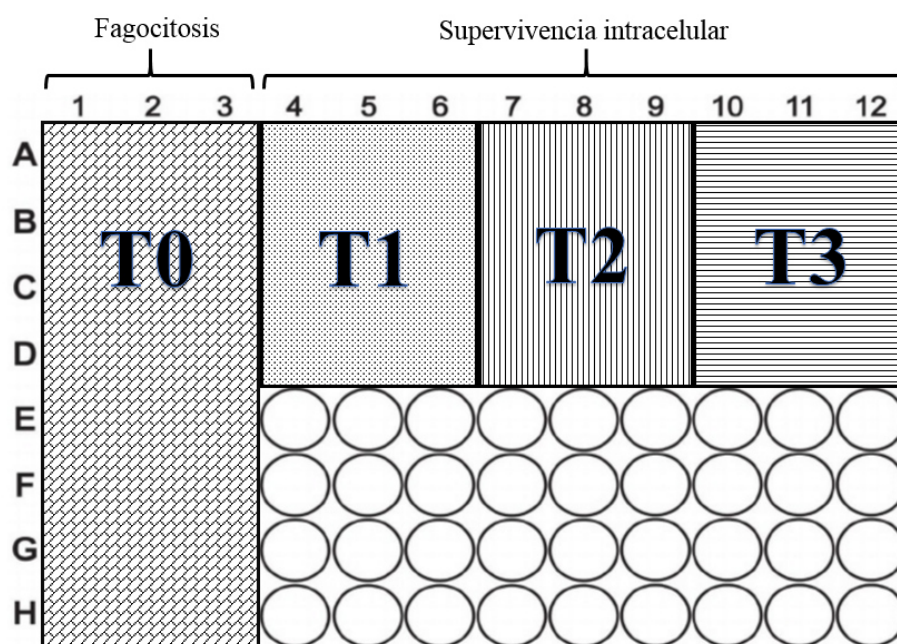


Figura 5. Diseño experimental de ensayos de fagocitosis y supervivencia intracelular. El tiempo cero (T0) representa a las 3 h y los tiempos 1, 2 y 3 (T1, T2 Y T3) representan a las 24, 48 y 72 h respectivamente.

Modelo experimental
MØ (Control negativo)
MØ + LPS (Control de activación)
MØ + <i>E.c.</i> (Control de fagocitosis)
MØ + LPS + <i>E.c.</i>
MØ + <i>E.c.</i> H.K.
MØ + LPS + <i>E.c.</i> H.K.
MØ + <i>E.c.</i> F.K.
MØ + LPS + <i>E.c.</i> F.K.

Tabla 2. Modelo experimental de los ensayos de fagocitosis y supervivencia intracelular. Se resumen los diversos tratamientos a los cuales fueron sometidas las células. La abreviatura “MØ” se refiere a macrófagos murinos, “H.K.” se refiere a esporas muertas por calor y “F.K.” se refiere a esporas muertas por formalina. Cada tratamiento se aplicó por triplicado y en tres repeticiones independientes.

7.2.2.- Tratamientos aplicados a esporas de *E. cuniculi*

(i) Calor constante de 90°C durante 30 min

Se tomó la suspensión celular (la cual contenía a las esporas previamente contabilizadas) y se hicieron ajustes de modo que la cantidad total de microorganismos a utilizar pudiese ser almacenada en tubos de microcentrífuga de 0.5ml. Estos tubos se colocaron en un bloque térmico AccuBlock^{MR} Digital Dry Bath (Labnet International, Nueva Jersey, EUA) para aplicarles una temperatura constante de 90°C durante 30 min. Finalmente, las esporas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

(ii) Fijación con formalina tamponada al 10% durante 30 min

Se tomó la suspensión celular (la cual contenía a las esporas previamente contabilizadas) y se hicieron ajustes de modo que se obtuviera la cantidad necesaria de microorganismos a utilizar. Esta suspensión fue depositada en un tubo Falcon[®] fondo cónico de 50ml para ser centrifugada a 1,500 x g durante 10 min y a 4°C en la centrifuga Universal 320R. Una vez formada la pastilla, el medio de cultivo fue removido y el sedimento fue resuspendido en 1 ml de formalina al 10%, para dejarlo actuando durante 30 min. Transcurrido este tiempo, el contenido fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 2ml y se centrifugó en una centrifuga Mikro 200R (Hettich Zentrifugen, Alemania) bajo las mismas condiciones, se decantó el sobrenadante conteniendo la formalina, la pastilla fue resuspendida con PBS y la suspensión fue sometida a centrifugación. Posteriormente, el proceso se repitió una vez más y al finalizar la pastilla fue resuspendida utilizando medio cRPMI 1640. Las esporas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

7.2.3.- Cosecha y siembra de macrófagos J774.A1

Una caja de cultivo celular ventilada de 25cm² conteniendo en su interior una monocapa de células J774.A1 de confluencia cercana al 80% fue seleccionada para la cosecha celular. El medio de cultivo fue removido mediante decantación y la caja fue lavada tres veces utilizando 3ml de PBS. Después de realizar los lavados, se

agregaron 10ml de medio de cultivo cRPMI 1640 y la caja fue raspada en su totalidad. La suspensión celular fue transferida a un tubo Falcon® fondo cónico de 50ml y homogenizada apropiadamente. Se recogieron 50µl y se depositaron en un tubo de microcentrífuga de 0.5ml en el cual se agregaron 50µl de Azul Tripán (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA). Se homogenizó bien la muestra haciendo 8 pipeteos para posteriormente tomar 10µl, depositarlos en las respectivas cámaras de Neubauer y así proceder al conteo celular en un microscopio invertido Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Overkochen, Alemania). A la par de que se contabilizaron las células, la suspensión celular fue centrifugada a 200 x g durante 10 min con una temperatura de 4°C en la centrifugadora Universal 320R.

Para la determinación del número total de células presentes en las suspensiones se tomaron en cuenta los cuatro cuadrantes grandes de las esquinas, aplicando la siguiente fórmula:

$$\#Total\ de\ células = \#de\ células\ de\ cuadrantes \times 0.25 \times FD \times 10,000 \times ml$$

Donde “FD” representa el factor de dilución y en este caso era de “2”, aplicando la misma fórmula utilizada para contabilizar esporas:

$$FD = \frac{VF}{VI}$$

$$FD = \frac{100\mu l}{50\mu l} = 2$$

CONSIDERACIONES IMPORTANTES:

*No permitir que las células experimenten más de 10 min de exposición al colorante Azul Tripán

*Células refringentes son consideradas células viables y aptas para ser contabilizadas

*Células opacas y de coloración azul oscuro/morado son consideradas células muertas

*Establecer desde un principio que bordes (internos o externos) serán considerados para la contabilización en caso de que algunas células se encuentren sobre estos

La pastilla fue resuspendida en medio cRPMI 1640 de tal modo que la cantidad de células a sembrar (1×10^4) estuviese contenida en un máximo de 200 μ l. Finalmente, las células fueron sembradas en un total de 60 pocillos (24 para pruebas de fagocitosis y 36 para evaluar supervivencia intracelular). La microplaca de 96 pocillos fue conservada incubándose hasta el día siguiente.

7.2.4.- Activación celular mediante LPS

Transcurridas 24 h desde la siembra, la microplaca fue observada en el microscopio invertido Axiovert 40 CFL para cerciorarse de la integridad de las células (morfología, confluencia, pulcritud). Consiguientemente, a 30 pocillos se les agregaron 100 μ l de medio cRPMI 1640 y a los 30 restantes se les agregaron 100 μ l de cRPMI 1640 suplementado con LPS a una concentración de 50ng/ml (*Castillo et al.*, 2011).

7.2.5.- Infecciones de macrófagos J774.A1

Al día siguiente (24 h posteriores), el medio de cultivo de todos los pocillos fue removido y sustituido por medio que contuviese 1×10^5 esporas de *E. cuniculi* para de este modo cumplir con una multiplicidad de infección de 10 a 1. Inmediatamente, los pocillos fueron aforados a 200 μ l de medio de cultivo.

7.2.6.- Colecta de sobrenadantes y esporas intracelulares

Transcurridas 3 h PI, se recogieron los sobrenadantes de todos los pocillos y estos se almacenaron en tubos de microcentrífuga a una temperatura de -20°C. Para esto los pocillos se lavaron mediante 3 pipeteos utilizando 200µl de PBS. Estos microlitros de PBS se agregaron al sobrenadante que fue recogido inicialmente para recolectar esporas que pudieran haberse quedado en el pocillo (Didier, 1995).

A los pocillos del tiempo cero (3 h) se les aplicaron 100µl de Tween 20[®] (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA) al 0.5% y a los pocillos de los tiempos 1, 2 y 3 (24, 48 y 72 h) se les suministraron 200µl de medio cRPMI 1640 solo o suplementado con LPS. La microplaca fue incubada durante 1 h para posteriormente dar paso a la colecta de esporas del tiempo cero (3 h) la cual fue llevada a cabo mediante 10 pipeteos. Inmediatamente se recolectaron los 100µl del detergente y se agregaron 100µl adicionales de PBS al pocillo y se repitió el proceso, las suspensiones se almacenaron en tubos de microcentrífuga a -20°C.

Los procesos de lisis celular mediante Tween 20[®] al 0.5% y colecta de esporas se repitieron para los tiempos 1, 2 y 3 a las 24, 48 y 72 h respectivamente.

7.2.7.- Microscopía óptica de alta resolución en cortes semifinos

Para corroborar la internalización de este parásito se llevó a cabo un ensayo independiente en el que 1×10^4 macrófagos J774A.1 contenidos en cajas de cultivo celular de 25cm² fueron infectados con 1×10^5 esporas de *E. cuniculi*. Al cabo de 3 h PI se prosiguió a lavar las cajas de cultivo celular mediante PBS para remover esporas no internalizadas. Posteriormente las células fueron despegadas mediante la suspensión Accutase^{MR} Cell Detachment Solution (Corning, Nueva York, EUA), se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 min y la pastilla celular se fijó durante 24 h con glutaraldehído al 2.5%. Después las muestras se lavaron brevemente con PBS 1X y se post-fijaron en tetraóxido de osmio acuoso al 2% durante 1 h a temperatura ambiente. En seguida las muestras se trataron con solución acuosa de nitrato de uranilo al 1% y se deshidrataron con concentraciones graduales de etanol (70-100%). Finalmente las muestras se embebieron en resinas epóxicas y se formaron bloques de

acuerdo con la técnica de Luft (1961). De los bloques se obtuvieron mediante ultramicrotomía cortes semifinos que se tiñeron con azul de toluidina al 1% y se analizaron en el microscopio óptico Omax LED 2500X con cámara Omax A3514OU 14.0MP. Después de cada paso se centrifugaron las muestras a 3,000 rpm durante 3 min para concentrar la pastilla celular.

7.2.8.- Determinación del índice fagocítico y valoración de la supervivencia intracelular

Para determinar el índice fagocítico se utilizó la siguiente fórmula general:

$$\text{Índice fagocítico} = \frac{\# \text{ de esporas}}{\# \text{ de células}}$$

Para valorar la supervivencia intracelular se utilizó la siguiente fórmula general:

$$\text{Supervivencia intracelular} = \frac{\# \text{ de esporas a determinado tiempo (24, 48 o 72 h)}}{\# \text{ de esporas al tiempo cero (3 h)}}$$

Para corroborar la infección de macrófagos J774A.1, estos fueron sembrados en cubreobjetos circulares que se encontraban dentro de una placa de cultivo celular de 6 pocillos, a una densidad de 1×10^4 e infectados con 1×10^5 . Transcurridas 3 h de infección los cubreobjetos fueron lavados con PBS y fijados con Metanol: Acetona. Se les aplicó Calcoflúor White siguiendo la metodología antes descrita.

7.3.- Medición de óxido nítrico

Para analizar la producción de ON se utilizó la reacción de diazotización inicialmente descrita por Griess (1879), siguiendo los protocolos de Sigma-Aldrich para la preparación de los reactivos y de un kit comercial para el análisis de las muestras (Promega, Wisconsin, EUA). La reacción entre sulfanilamida (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA), dihidrocloruro de *N*-1-naftil-etilendiamina (NED) (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA) y la muestra, tiene como objetivo la detección de nitritos (NO_2^-), estables y no volátiles productos del rompimiento del ON. Se produce una

coloración rosada en función de la cantidad de nitritos presentes en la muestra, y esta debe leerse en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm.

7.3.1.- Preparación de una curva de referencia estándar de nitritos

Se preparó una curva de calibración utilizando medio cRPMI 1640 como matriz, siguiendo la metodología del kit comercial de Promega. Los pasos que se llevaron a cabo fueron los siguientes:

- 1.- Se preparó 1ml de solución de nitritos al 100 μ M diluyendo 1 μ l de la solución stock de nitrito de sodio (NaNO_2) de 0.1M en 999 μ l de la matriz (cRPMI 1640) usada para los experimentos (1: 1,000).
- 2.- Se designaron 3 columnas (24 pocillos) en una microplaca de 96 pocillos. Se dispensaron 50 μ l de la matriz en los pocillos B-H.
- 3.-Se agregaron 100 μ l de la solución de nitritos al 100 μ M en los 3 pocillos de la fila A.
- 4.- Se realizaron 6 diluciones (50 μ l/pocillo) en triplicado y hacia abajo (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 y 1.56 μ M), descartando los 50 μ l que se tomaron del set de pocillos de 1.56 μ M. Los pocillos de la fila “H” no recibieron nitritos ya que representan a la molaridad 0 μ M. De este modo todos los pocillos tuvieron un volumen final de 50 μ l y el rango de concentración de nitritos fue de 0 a 100 μ M.

Se aplicaron primeramente 50 μ l de sulfanilamida (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA) sobre cada pocillo y la microplaca se mantuvo incubando a 37°C durante 10 min. Posteriormente se aplicaron 50 μ l de NED (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA) a todos los pocillos y la microplaca se incubó a 37°C durante 10 min adicionales. Una coloración morada/magenta se formó fuertemente en los pocillos con una mayor concentración de nitritos como puede observarse en la figura 6. Finalmente, la absorbancia de la microplaca fue leída a 540nm en un espectrofotómetro Epoch[®] (BioTek, Vermont, Estados Unidos).



Figura 6. Curva de calibración de NaNO_2 . Se utilizaron distintas diluciones, siendo los pocillos de la fila “A” los que representan al $100\mu\text{M}$ y los pocillos de la fila “H” al $0\mu\text{M}$.

Se graficaron la absorbancia promedio de cada concentración de nitrito como función “Y” y la concentración de nitritos como función “X”. La fórmula de regresión lineal simple es la siguiente:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x$$

Donde β_0 representa parámetro “intercepto” y β_1 representa parámetro “pendiente”. La curva de referencia puede apreciarse en la figura 7.

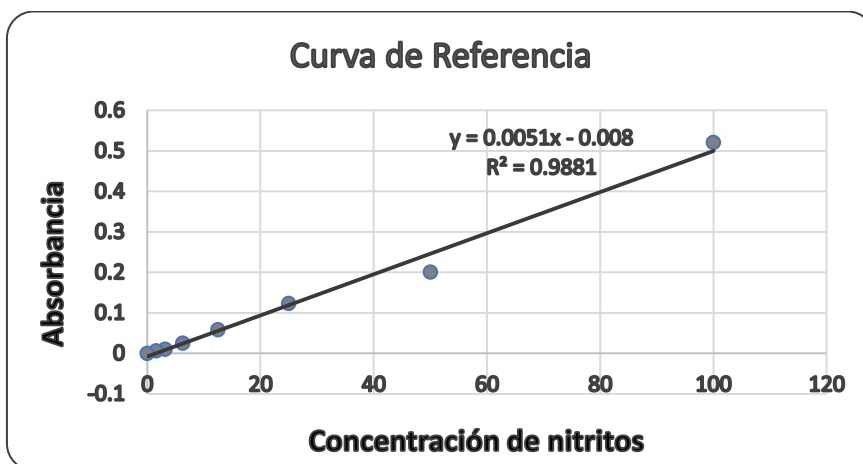


Figura 7. Curva de referencia de nitritos. Se utilizó cRPMI 1640 como matriz. El valor $0.0051x$ representa el parámetro “intercepto” y el valor 0.008 representa el parámetro “pendiente”.

7.3.2.- Determinación de óxido nítrico presente en sobrenadantes

Para el análisis de ON fueron utilizados los sobrenadantes que se recogieron de las pruebas de fagocitosis y supervivencia intracelular en los distintos tiempos de colecta (3, 24, 48 y 72 h) y se siguió la metodología del kit comercial de Promega.

Brevemente se colocaron 50µl de muestra en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos. Se aplicaron primeramente 50µl de sulfanilamida a todos los pocillos y la microplaca se incubó a 37°C durante 10 min. Transcurrido este tiempo se aplicaron 50µl de NED a todos los pocillos y la microplaca fue igualmente incubada a 37°C y durante 10 min. Finalmente, la absorbancia fue leída en el espectrofotómetro Epoch® a una longitud de onda de 540nm.

Para la determinación de nitritos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{NO}_2^- = \frac{\text{Valor promedio de absorbancia}}{\text{Valor del parámetro "pendiente"}}$$

7.4.- Evaluación de la viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad celular a distintos tiempos (T0, T1, T2 y T3) y bajo distintos tratamientos utilizando la técnica de MTT. Esta técnica se basa en el principio de la formación de cristales de formazán al ser metabólicamente reducida la sal de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por parte de la enzima succinato-deshidrogenasa presente en mitocondrias de células vivas. El anillo de tetrazolio se rompe únicamente cuando las mitocondrias se encuentran metabólicamente activas. La incapacidad para formar cristales se asocia a su vez con muerte celular (Mosmann, 1983).

7.4.1.- Diseño experimental

Para los ensayos de viabilidad celular el SFBI se aplicó en una concentración del 2% para evitar que las células crecieran demasiado rápido y murieran al pasar los días debido a altas confluencias.

Primeramente se determinó el número de células a utilizar de acuerdo al protocolo ya conocido (Mosmann, 1983). Este consiste en sembrar células a diferentes densidades y realizar la técnica sin llevar a cabo tratamientos. Aquellas concentraciones celulares que mostraron valores en el espectrofotómetro superiores a “1” fueron consideradas apropiadas para los ensayos. En el caso de macrófagos murinos, se optó por utilizar una concentración de 5×10^4 células por pocillo.

Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y en tres repeticiones independientes. La microplaca se dividió en cuatro tiempos (T0= 3 h, T1= 24 h, T2=48 h y T3=72 h) tal como se aprecia en la figura 8. Como control negativo de viabilidad se utilizaron células a las que se les privó de medio de cultivo por 24 h. También se determinó la absorbancia de células “blanco” y la absorbancia de esporas de *E. cuniculi* por separado. Los tratamientos se resumen en la tabla 3.

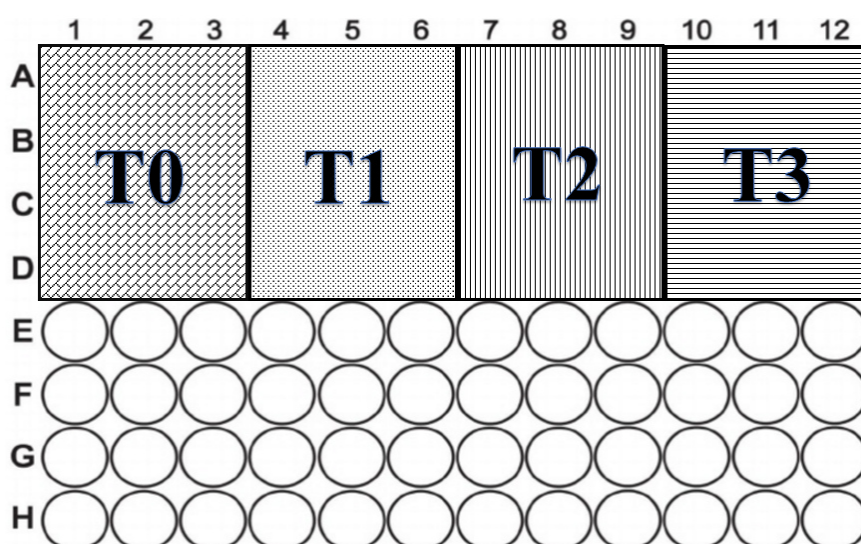


Figura 8. Diseño experimental para los ensayos de viabilidad celular. Donde T0=3 h, T1=24 h, T2=48 h y T3= 72 h.

Modelo Experimental
Control Positivo: MØ
MØ + LPS
MØ + LPS + <i>E. c.</i>
MØ + <i>E. c.</i>
Control Negativo: MØ inviables

Tabla 3. Modelo experimental de los ensayos de viabilidad celular. Se resumen los tratamientos a los cuales fueron sometidas las células. La abreviación “MØ” se refiere a macrófagos murinos. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y en tres repeticiones independientes.

7.4.2.- Ensayos de viabilidad celular

Se sembraron 5×10^4 células por pocillo en un total de 48 pocillos para mantenerlas incubando durante 24 h utilizando medio cRPMI 1640. Al día siguiente la mitad de las células en pocillos fueron activadas utilizando LPS a una concentración de 50ng/ml y la mitad restante fue completada únicamente con medio cRPMI 1640. Transcurridas 24 h se procedió a infectar a las células con 5×10^5 esporas por pocillo para de este modo cumplir con la multiplicidad de infección de 10 a 1. Al cabo de 3 h, todos los pocillos se lavaron mediante pipeteo para remover esporas no internalizadas y restos celulares. Se completaron los pocillos del tiempo cero con 100µl de medio DMEM (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA) y 50µl de MTT (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA) a una concentración de 1mg/ml (Denizot & Lang, 1986). Los pocillos de los tiempos 1, 2 y 3 fueron completados con 200µl de medio cRPMI 1640 suplementado o no con LPS.

La microplaca se incubó durante 4 h y al cabo de este período el contenido total del pocillo se removió y los cristales de formazán que se encontraban en el fondo fueron disueltos utilizando DMSO al 100%, acto seguido de una incubación adicional de 30 min a temperatura ambiente (Wang *et al.*, 2012). Al cabo de este lapso los pocillos del tiempo cero fueron leídos en el espectrofotómetro Epoch® a una longitud de onda

de 570nm. Durante el proceso, los pocillos restantes se cubrieron con parafilm (American National Can, Chicago, EUA) para evitar la contaminación. El proceso se repitió a las diferentes horas de estudio.

Para determinar la viabilidad celular se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\text{DO de células tratadas}}{\text{DO de células control}} \times 100$$

7.5.- Análisis Estadístico

Los datos de los ensayos de fagocitosis fueron analizados usando un ANOVA de una cola con una comparación de medias de Newman-Keuls.

Los datos de supervivencia intracelular, ON y viabilidad celular fueron analizados utilizando un ANOVA de dos colas con una comparación de medias de Bonferroni.

Se utilizó el programa de GraphPad Prism 4 para la generación de gráficos.

8.-RESULTADOS

8.1.- Establecimiento de *E. cuniculi* y cosecha de sus esporas

El cultivo celular de células Vero E6 fue adecuado para la propagación de esporas de *E. cuniculi*. Durante la primera semana post-infección (PI), se observó que un 20% de las células se encontraban infectadas con escasas esporas. Sin embargo, durante la segunda y tercera semana PI, se pudo observar que el 100% de las células lucían repletas de esporas de *E. cuniculi*. En las figuras 9-11 pueden apreciarse los cambios morfológicos experimentados en diversas etapas de la infección como lo son agrandamiento citoplasmático, generación de una vacuola parasitófora la cual contiene en su interior a los microorganismos en replicación y es causante del agrandamiento celular. Por caja de cultivo celular de 25cm² se produjeron en promedio entre 5x10⁶ y 20x10⁶ esporas por ml entre la tercera y cuarta semana PI.

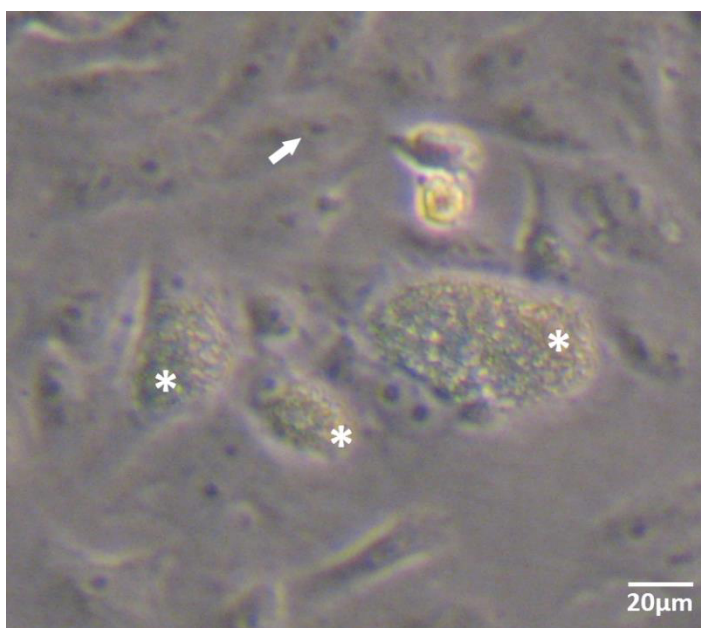


Figura 9. Células Vero E6 infectadas con *E. cuniculi*. Se observa una aparente célula sana (flecha). Se observan además vacuolas parasitóforas de células afectadas (asteriscos). Fotografía correspondiente a la primera semana post-infección. Microscopio invertido. Sin filtro. 25x.

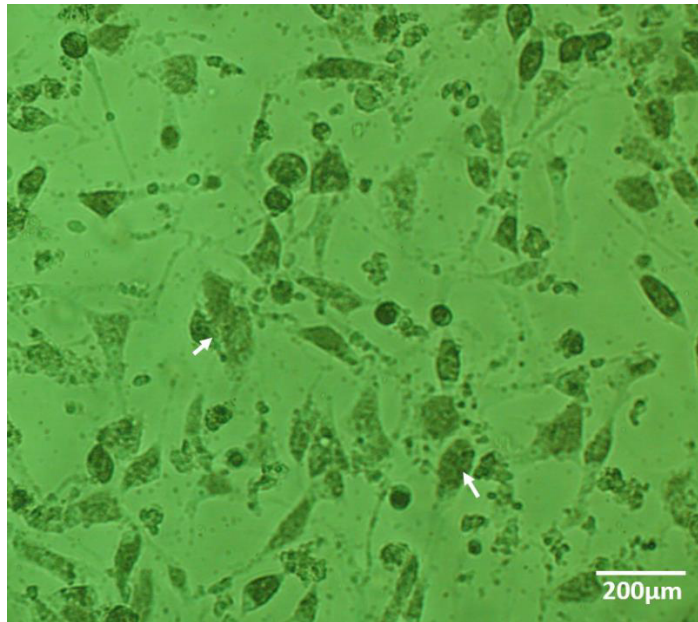


Figura 10. Células Vero E6 infectadas con *E. cuniculi*. Se observa una gran cantidad de vacuolas parasitóforas (flechas). Existe en este punto un 100% de afectación. Microscopio invertido. Fotografía correspondiente a la 3ra semana post-infección. Filtro color verde. 4x.

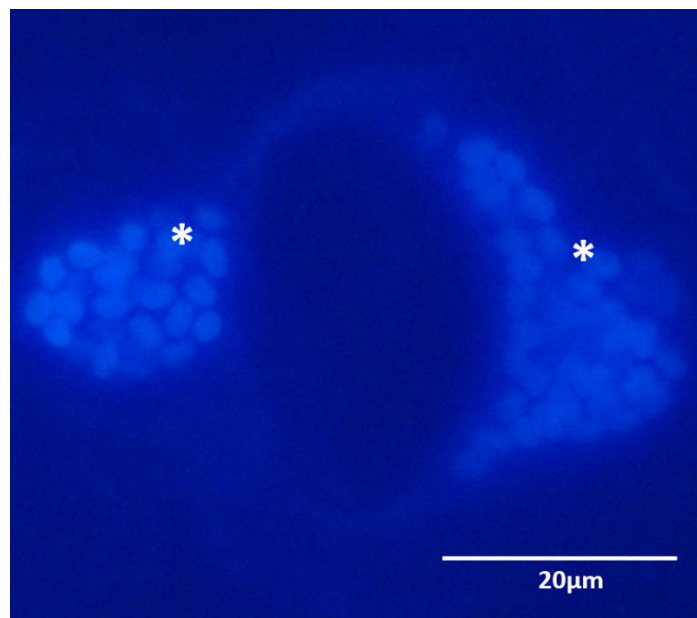


Figura 11. Célula Vero E6 en la 3era semana post-infección. Se observan vacuolas parasitóforas a cada lado del núcleo celular (asteriscos) donde se encuentra replicando *E. cuniculi*. Microscopía de Epifluorescencia. Calcoflúor White. 100x

8.2.- Determinación del índice de fagocitosis de esporas de *E. cuniculi* por macrófagos murinos J774A.1

Existen dos maneras para evaluar la actividad fagocítica de los macrófagos: 1) Evaluación del porcentaje de fagocitosis (porcentaje de células que presentan actividad fagocítica) y 2) Evaluación del índice fagocítico (el número de patógenos ingeridos por célula fagocítica), este último método es el más sensible de los dos y es el que se utilizó en este trabajo para determinar la internalización de los microorganismos (Leiro *et al.*, 1995; Narnaware, Baker, 1994).

El tratamiento que involucró esporas fijadas con formalina (FK) fue el que produjo el porcentaje de internalización más bajo con un 61.1%, seguido de los tratamientos que involucraron esporas muertas con calor (HK) y células previamente activadas con LPS (LPS + HK) con porcentajes del 94.4%. El tratamiento con células activadas y esporas fijadas con formalina (LPS + FK) mostró un valor del 100% mientras que el tratamiento que involucró células activadas y esporas vivas (LPS + *E.c.*) resultó ser el que produjo el mayor porcentaje de internalización entre todos los tratamientos con un 172.3%, superando inclusive al control positivo (*E.c.*). Todos los tratamientos produjeron una diferencia significativa ($P \leq 0.01$) respecto al control positivo (*E.c.*). Se observó además una diferencia significativa ($P \leq 0.01$) al comparar todos los tratamientos entre sí, más no entre los tratamientos que involucraron esporas muertas por calor (HK y LPS + HK). Lo anterior se resume en la figura 12. También puede observarse en la figura 13 como esporas de *E. cuniculi* son fagocitadas por macrófagos J774A.1.

Al observar los cortes semifinos de los diversos tratamientos se pudo constatar que efectivamente el número de microorganismos es menor en tratamientos con esporas muertas con calor y formalina; y que la activación celular mediante LPS consigue incrementar la cantidad de esporas internalizadas a comparación del tratamiento control que incluyó esporas intactas. Lo anterior puede apreciarse en las figuras 14-17.

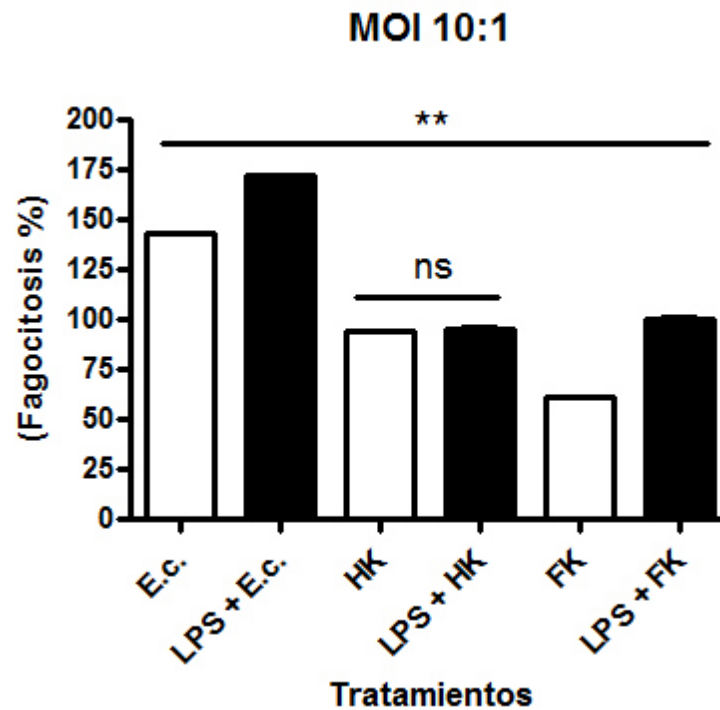


Figura 12. Índice de fagocitosis de esporas de *E. cuniculi* con un tiempo de incubación de 3 h. Los resultados se encuentran expresados en porcentaje y cada valor representa la media \pm SD Existe diferencia significativa ($P \leq 0.01$) entre todos los tratamientos excepto entre “HK” y “LPS + HK”.

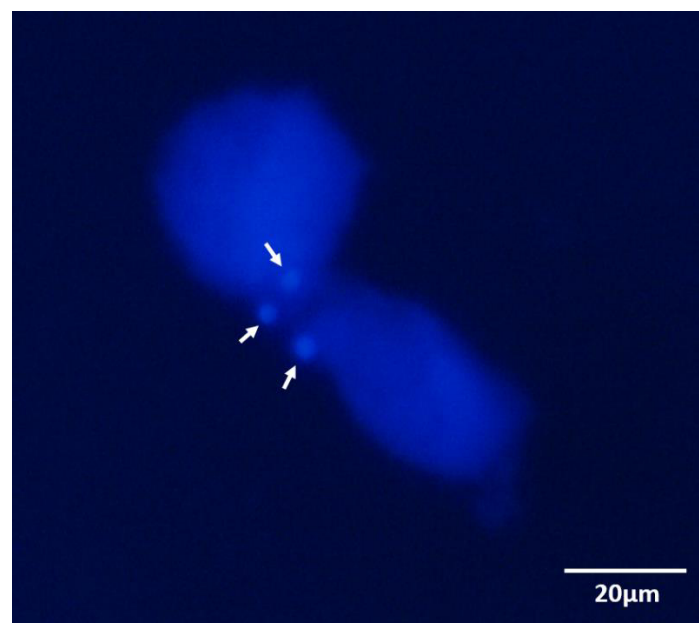


Figura 13. Macrófagos J774A.1 fagocitando esporas de *E. cuniculi*. Se observan esporas al ser fagocitadas (flechas). Fotografía correspondiente a las 3 h post-infección. Microscopía de Epifluorescencia. Calcoflúor White. 100x

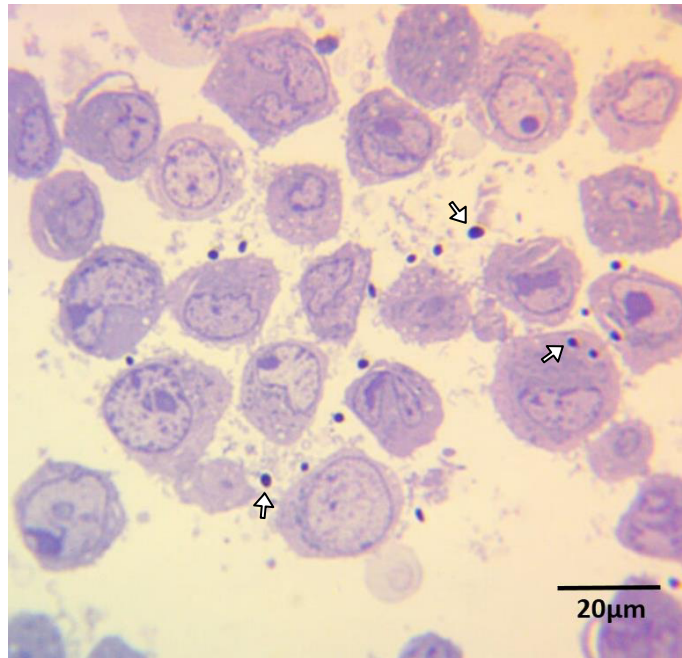


Figura 14. Macrófagos J774A.1 expuestos a esporas de *E. cuniculi*. Se observan esporas extra e intracelulares (flechas). Fotografía correspondiente a 3 h post-infección. Microscopía láser de alta resolución. Azul de Toluidina al 1%. 100x

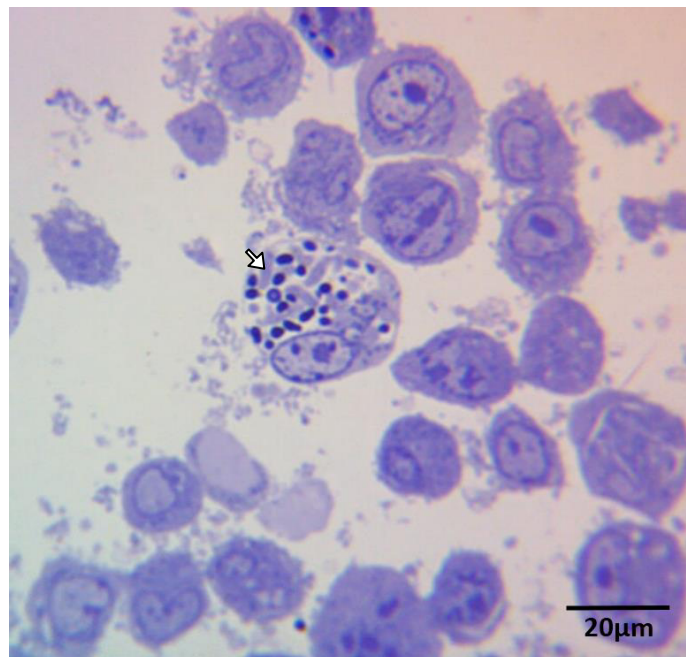


Figura 15. Macrófagos J774A.1 activados con LPS y expuestos a esporas de *E. cuniculi*. Se observa una posible vacuola parasitófora conteniendo en su interior una gran cantidad de microorganismos (flecha). Fotografía correspondiente a 3 h post-infección. Microscopía láser de alta resolución. Azul de Toluidina al 1%. 100x

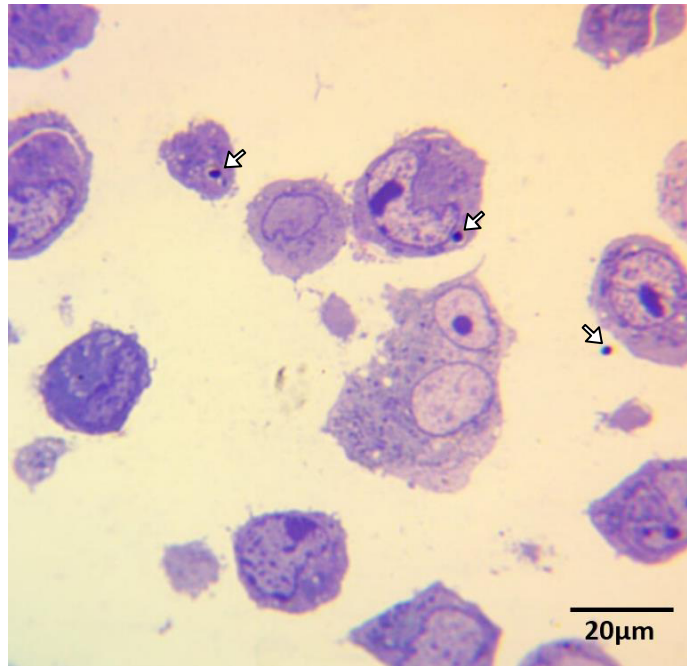


Figura 16. Macrófagos J774A.1 expuestos a esporas de *E. cuniculi* muertas por calor. Se observan esporas de *E. cuniculi* tanto extra como intracelularmente (flechas). Fotografía correspondiente a 3 h post-infección. Microscopía láser de alta resolución. Azul de Toluidina al 1%. 100x

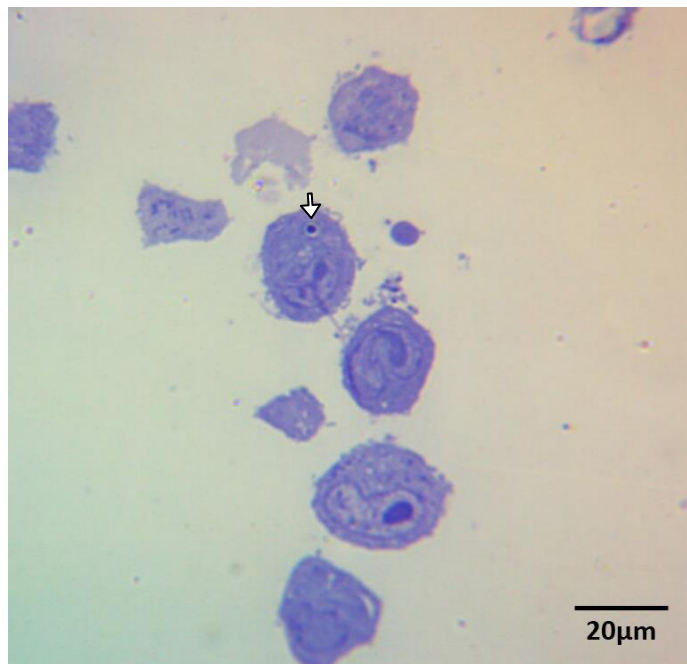


Figura 17. Macrófagos J774A.1 expuestos a esporas de *E. cuniculi* muertas por formalina. Se observa una espora internalizada (flecha). Fotografía correspondiente a 3 h post-infección. Microscopía láser de alta resolución. Azul de Toluidina al 1%. 100x

8.3.- Valoración de la supervivencia intracelular de *E. cuniculi* en macrófagos murinos J774A.1

La supervivencia intracelular de estos agentes infecciosos está bien documentada en células epiteliales y endoteliales. Aunque se conoce que *E. cuniculi* puede infectar macrófagos, la señalización celular y su posterior producción de citocinas favorece su eliminación. En los ensayos de supervivencia intracelular de este trabajo se buscó emular a la activación celular mediada por la citocina IFN- γ mediante la utilización de LPS a una concentración de 50ng/ml. Con esto se pretendía observar la efectiva eliminación de este parásito.

En el tratamiento de activación celular (MØ + LPS + *E.c.*) se encontró una disminución altamente significativa ($P \leq 0.001$) en la supervivencia intracelular a las 24 h con un 72.4% respecto al tratamiento control (MØ + *E.c.*), donde la supervivencia intracelular fue de un 93%. Para las 48 h se mantuvo este patrón ya que la supervivencia intracelular en el tratamiento de activación (MØ + LPS + *E.c.*) fue de 41.4% y en el tratamiento control (MØ + *E.c.*) esta fue mayor con un 62.2%. Inesperadamente, a las 72 h la supervivencia intracelular de *E. cuniculi* en el tratamiento control (MØ + *E.c.*) con un 100% fue significativamente menor ($P \leq 0.001$) a la observada en el tratamiento de activación (MØ + LPS + *E.c.*) donde el porcentaje alcanzó el 122.6%. Existe una diferencia altamente significativa entre los tratamientos de control (MØ + *E.c.*) y de activación (MØ + LPS + *E.c.*) en los tres tiempos (24, 48 y 72 h). Lo anterior se resume en la figura 18.

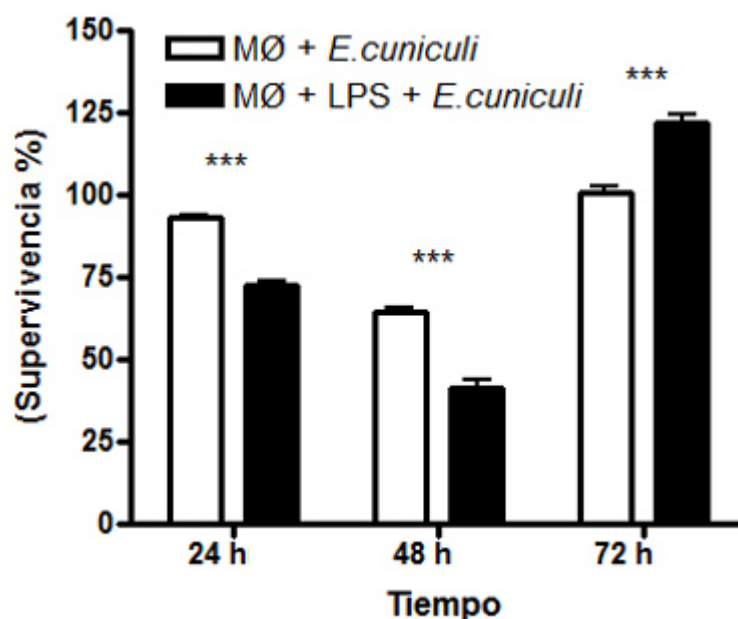


Figura 18. Supervivencia intracelular de *E. cuniculi*. Los resultados se encuentran expresados en porcentaje y cada valor representa la media \pm SD. Existe diferencia altamente significativa ($P \leq 0.001$) entre tratamientos de los tres distintos tiempos.

8.4.- Cuantificación de la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos J774A.1 infectados con *E. cuniculi*

Como se mencionó anteriormente, la activación celular es capaz de influir sobre la expresión de genes relacionados con la enzima encargada de producir grandes cantidades de ON. La finalidad de analizar la concentración de esta molécula en sobrenadante de cada uno de los tratamientos era el de asociarla con activación celular ya sea inducida por previa exposición a LPS o por la presencia de esporas de *E. cuniculi*.

En este trabajo, la producción de ON a las 3 h fue similar en los cuatro tratamientos teniendo como valor promedio una concentración de nitritos de $16 \mu\text{M}$. En el tratamiento control (MØ) no se observaron diferencias en la producción de ON a ningún tiempo como sí se evidenciaron en los demás tratamientos a las 72 h. En el tratamiento que involucró activación celular (MØ + LPS) se encontró una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre las 3 y 72 h donde las concentraciones de nitritos fueron de $15.79 \mu\text{M}$ y $19.62 \mu\text{M}$ respectivamente. Asimismo, se observó en el tratamiento de

infección (MØ + *E.c.*) una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre las 3 y 72 h con concentraciones de $15.96 \mu\text{M}$ y $19.73 \mu\text{M}$ respectivamente. Lo anterior se resume en la figura 19.

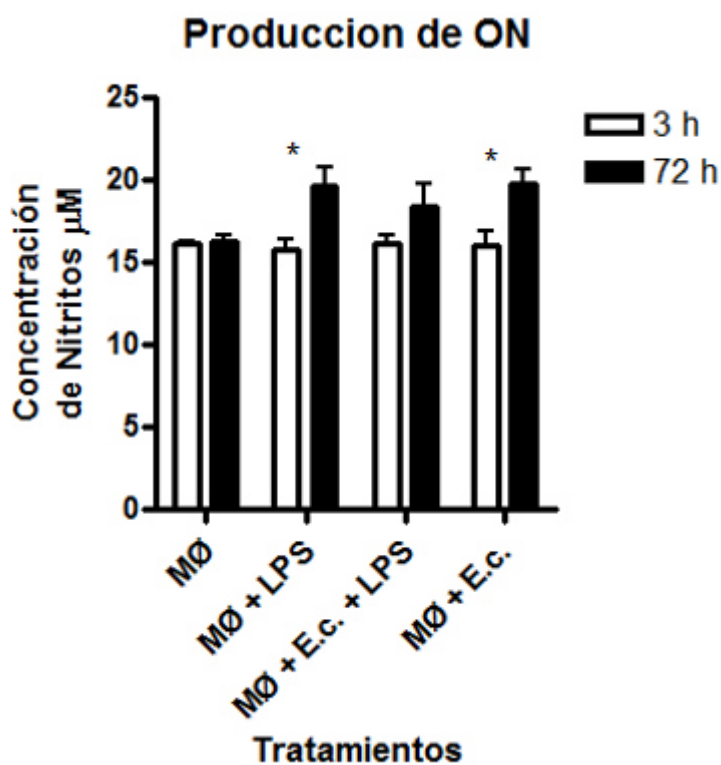


Figura 19. Concentración de nitritos presente en sobrenadante. Los resultados se encuentran expresados en molaridad y cada valor representa la media \pm SD. Existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en dos tratamientos (MØ + LPS y MØ + *E.c.*) entre las 3 y 72 h.

8.5.- Evaluación de la viabilidad celular de macrófagos J774A.1 expuestos a *E. cuniculi*

En cuanto a los resultados de este trabajo, no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular entre tratamientos a distintos tiempos. Sin embargo, al comparar macrófagos infectados entre las 3 y 72 h se encontró una diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Los porcentajes de viabilidad fueron en lo general del 100% aunque parece que la activación celular y el desafío con esporas de *E. cuniculi* redujo el metabolismo mitocondrial y/o la proliferación celular entre las 3 y 48 h. A las 72 h producen una mayor cantidad de cristales de formazán las células bajo activación e infección. El control negativo contemplado incluyó células a las que se les privó de medio de cultivo por 24 h y como era de esperarse no se formaron cristales de formazán por lo que la viabilidad celular fue nula en este tratamiento. Lo anterior se resume en las figuras 20 y 21.

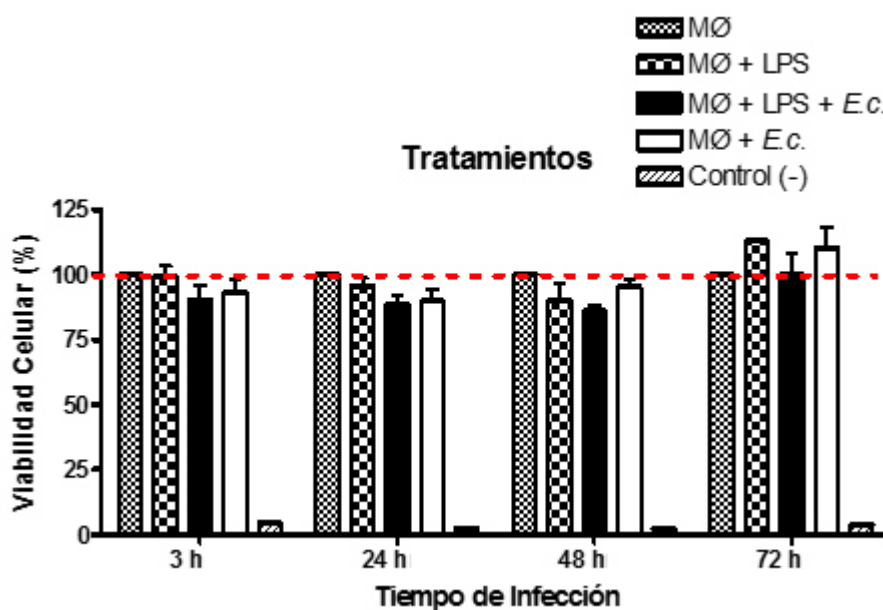


Figura 20. Viabilidad celular de macrófagos J774A.1 expuestos a *E. cuniculi*. El control negativo está representado por células a las que se les privó de medio de cultivo. Los resultados se encuentran expresados en porcentaje y cada valor representa la media \pm SD. No existe diferencia significativa entre los tratamientos de cada uno de los tiempos analizados.

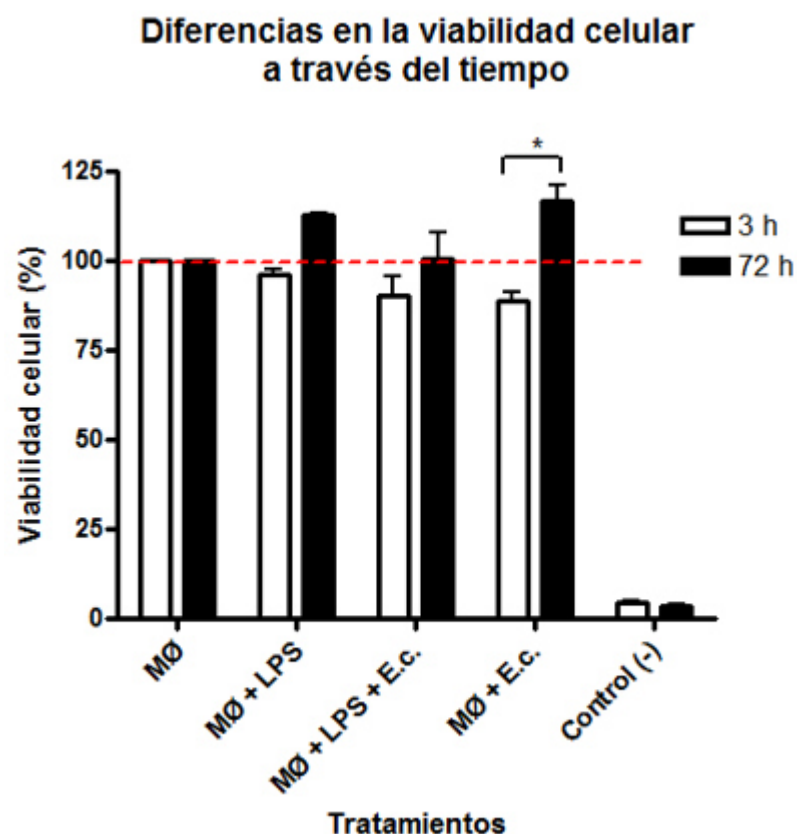


Figura 21. Viabilidad celular de macrófagos J774A.1 expuestos a *E. cuniculi*. El control negativo está representado por células a las que se les privó de medio de cultivo durante 24 h. Los resultados se encuentran expresados en porcentaje y cada valor representa la media \pm SD. Existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre las 3 y 72 h del tratamiento “MØ + *E.c.*”.

9.- DISCUSIÓN

E. cuniculi es un patógeno oportunista, emergente y zoonótico que presenta una amplia diseminación entre conejos a nivel mundial y que es capaz de transmitirse a un gran número de mamíferos incluido el hombre. La producción de esporas resistentes al medio ambiente le confiere a este parásito la capacidad de ser transmitido a través de agua y alimentos con relativa facilidad (Didier, 2005). En los últimos treinta años se han llevado a cabo estudios encaminados a describir la respuesta inmune del hospedador hacia la exposición de esporas de *E. cuniculi*, utilizando conejos o ratones para experimentación. Se ha reportado que aquellos animales inmunosuprimidos o carentes de poblaciones de linfocitos T los que generalmente sucumben a infecciones microsporidianas (Salát *et al.*, 2002).

Se ha sugerido por varios autores que en individuos inmunocomprometidos los macrófagos podrían acarrear las esporas por vía sanguínea o linfática llegando a afectar órganos primordiales como riñón o encéfalo. Esta condición se ve favorecida por una baja señalización intercelular la cual es producto de poblaciones celulares disminuidas (Valencakova & Halanova, 2012).

En macrófagos humanos el reconocimiento de lipoproteínas de superficie de la espora de *E. cuniculi* mediante receptores TLR2 produce una señalización que favorece la producción de citocinas como IL-8 y TNF- α (Fischer *et al.*, 2008). Además la digestión de estos microorganismos provoca que estas células sinteticen IL-12 la cual en el hospedador provoca que los linfocitos T y NK produzcan IFN- γ , la cual activa a los macrófagos y los vuelve aptos para controlar la infección estimulando la fagocitosis y posterior incremento de moléculas como ON (Fischer *et al.*, 2008). Sin embargo, cuando los animales se encuentran inmunocomprometidos (c.p.e. cuando cursan con alguna infección que comprometa a las células blancas o cuando reciben tratamientos inmunosupresores se pueden crear las condiciones para que este mecanismo de control resulte infructuoso (Valencakova & Halanova, 2012).

Una de las ventajas de trabajar con un modelo basado en cultivo celular es que se puede analizar el comportamiento individual de determinada estirpe celular. En este análisis de la respuesta inmune de macrófagos murinos peritoneales de ratón se descarta la influencia externa de citocinas pro-inflamatorias producidas por células T o NK, y se estudia una respuesta inmune exclusivamente de tipo innata.

El reconocimiento de LPS por parte de receptores TLR4 en los macrófagos murinos produce la activación de diversos factores de transcripción que terminan por producir citocinas pro-inflamatorias como son IL-1, IL-6 y TNF- α , las cuales estimularán a los mismos macrófagos incrementando su motilidad y favoreciendo a la fagocitosis (Tizard, 2013).

Una parte de este estudio consistió en desafiar a los macrófagos murinos a esporas de *E. cuniculi*, las cuales se presentaron de dos maneras: Esporas intactas (aquellas con la capacidad de infectar células) y esporas inviables (sometidas a tratamientos que comprometiesen su viabilidad). Para llevar a cabo lo anterior, primeramente se consideró en base a la literatura que los métodos para evaluar la viabilidad de las esporas son lentos, costosos y basados generalmente en microscopía de fluorescencia (Green *et al.*, 2000) y/o infección exitosa de cultivos celulares (John *et al.*, 2005).

Para tener certeza sobre la inviabilidad de las esporas de *E. cuniculi* utilizadas en este trabajo y en base a los resultados de (Waller, 1979), se optó por someterlas a una temperatura de 90°C y a formalina tamponada al 10%. Como complemento a esto se sabe que la exposición de esporas microsporidianas a 60°C durante 10 min y a formalina al 4% por 24 h es suficiente para inactivarlas según lo recomendado en la literatura (Leiro *et al.*, 2012).

Leiro *et al.* (1996) encontraron que la utilización de sodio m-periodado sobre esporas del microsporidio *Glugea culleyi* reduce la internalización de las mismas en células fagocíticas de bazo del pez rodaballo (*Scophthalmus maximus*). El objetivo principal de la utilización de sodio m-periodado era el de modificar la estructura de los azúcares presentes en las glucoproteínas de superficie de las esporas de *Glugea culleyi*. En ese ensayo se utilizó una multiplicidad de infección de 85 a 1 y el índice de fagocitosis fue evaluado a los 145 min PI. Los resultados evidencian un índice fagocítico de 7 (700%) en esporas intactas y 4 (400%) en esporas tratadas con sodio m-periodado. Esta alteración ocasionó que las esporas no fueran detectadas apropiadamente para ser fagocitadas.

En el presente estudio, los tratamientos que involucraron esporas intactas mostraron un índice fagocítico de 1.44 (144%), mientras que esporas muertas (HK o FK) presentaron índices de 0.94 (94%) y 0.61 (61%) respectivamente. Probablemente los índices de fagocitosis aquí presentados sean menores debido a que se utilizó una

multiplicidad de infección menor (10:1). No obstante, en ambos trabajos se observa una disminución similar en la ingesta fagocítica cuando la integridad de la exospora se ve comprometida.

La temperatura a la cual fueron sometidas las esporas utilizadas en este estudio pudo también haber alterado la estructura y/o conformación nativa de glicoproteínas de superficie como la proteína uno de la pared de la espora (SWP1) (Peuvel *et al.*, 2006) mediante la modificación de la posición original de las subunidades proteicas, lo que a su vez posiblemente propicio a que las esporas perdieran su capacidad inmunogénica y no fueran reconocidas por los macrófagos (Dill & Shortle, 1991; Tanford, 1968). Las esporas muertas por formalina tamponada al 10% fueron internalizadas en una proporción aún menor y esto probablemente se deba a la unión de la formalina a grupos funcionales de las proteínas. La unión a uno de los diferentes grupos funcionales que poseen las proteínas produce grupos de hidroximetileno que pueden estar reaccionando con grupos de otra o de la misma proteína formando puentes que estén enmascarando o vuelvan irreconocibles a las proteínas de superficie (Pacheco, 2016).

Asimismo Leiro *et al.* (1997) encontraron que los tratamientos de esporas de *Glugea culletyi* con enzimas quitinolíticas (20 UI/ml) y proteolíticas (2745UI/ml) reducen el índice fagocítico de estas cuando son expuestas a macrófagos de bazo del pez rodaballo (*Scophthalmus maximus*). Esta reducción se argumenta que es debida a la pérdida de glicoproteínas antigénicas de superficie.

Los medios físicos y químicos utilizados en este trabajo pudieron desnaturalizar a las proteínas de superficie o formar puentes entre ellas a tal grado de volverlas irreconocibles. Si bien la temperatura constante de 90°C no es capaz de lisar a las proteínas de pared, esta es capaz de ocasionar alteraciones cruciales que las vuelve pobremente inmunogénicas al verse comprometida su complejidad, en el entendido de que entre más compleja es una proteína mayor es su grado inmunogenicidad (Iáñez, 1999).

Lo encontrado en este estudio coincide con lo observado en el trabajo de Leiro *et al.* (2000) en donde al evaluar el índice de fagocitosis de esporas viables y no viables de *Microgemma caulleryi* en macrófagos de bazo de pez rodaballo (*Scophthalmus*

maximus), se encontró que las esporas inviables son internalizadas en menor proporción (250%) que las esporas viables (350%).

En ese mismo año Couzinet *et al.* (2000) encontraron que esporas de *E. cuniculi* muertas con formalina al 4% son internalizadas en la misma proporción que esporas sin tratamiento. Esto contrasta con lo encontrado en este trabajo; no obstante, debe de resaltarse que ellos utilizaron fibroblastos pulmonares humanos (células MRC5) los cuales no son fagocitos profesionales por lo que la maquinaria de expresión de receptores de superficie pudiera ser distinta y la adición de formalina a una concentración menor pudo haber conducido a una modificación parcial y no total de las proteínas de superficie.

Existe discrepancia con lo reportado por Nasonova (2001) donde mencionan que esporas de *N. grylli* tratadas con calor son internalizadas del mismo modo que esporas intactas, sin embargo en ese estudio no se menciona a que temperatura fueron tratadas y ese factor puede ser determinante ya que a diferentes temperaturas las proteínas pueden perder o no su inmunogenicidad dependiendo de su conformación.

Los ensayos de supervivencia intracelular demostraron que independientemente de existir o no una previa activación celular con LPS a una concentración de 50ng/ml, *E. cuniculi* puede sobrevivir dentro de macrófagos más allá de 48 h. La disminución en la carga microsporidiana a las 24 y 48 h en células activadas (MØ + LPS + *E.c.*) hace pensar que existe cierto control de la infección; sin embargo, a las 72 h estos microorganismos aumentan en número en células control (MØ + *E.c.*) y aumentan aún más en células previamente activadas (MØ + LPS + *E.c.*). Una posible explicación al porque se encontró una mayor cantidad de microorganismos en macrófagos activados puede ser que al incrementarse significativamente ($P \leq 0.01$) la fagocitosis de esporas de *E. cuniculi* se favoreció el que a las 72 h el número de estas fuese mayor en este tratamiento (MØ + LPS + *E.c.*) que en el tratamiento control (MØ + *E.c.*). Este planteamiento pone en duda la eficacia de estas células para controlar la infección por *E. cuniculi* cuando son activadas con LPS a una concentración de 50ng/ml. Podría a su vez considerarse la posibilidad de que los macrófagos requieran forzosamente a la respuesta inmune adquirida para eliminar

eficientemente a este parásito intracelular como ya se ha sugerido en otros estudios (Niederhorn & Shadduck, 1980).

Didier (1995) encontró que la replicación microsporidiana en macrófagos peritoneales de ratón se ve disminuida cuando estas células son previamente activadas con LPS (10ng/ml) y rIFN- γ (100 U/ml) o con una combinación de citocinas (10%) a las 24 y 48 h después de la adición de los parásitos. En ese trabajo el número de organismos por 100 macrófagos pasó de 138 esporas a las 3 h a 45 esporas ($P<0.05$) a las 24 h y a 43.9 esporas ($P<0.001$) después de 48 h. Contrario a esto, en los cultivos que no fueron activados se incrementó el número de parásitos por cada 100 macrófagos a las 48 h pasando de 143 esporas ($\pm 25-46$) a las 3 h a 391.33 esporas ($\pm 24-54$) a las 48 h. Se encontró que la activación de macrófagos murinos peritoneales con LPS a una concentración de 10ng/ml resulta insuficiente para inhibir la replicación microsporidiana.

En ese trabajo la adición de LPS pudiera estar ayudando a que se incremente el número de microsporidios ingeridos y la utilización de IFN- γ puede estar en efecto contribuyendo a la eliminación del parásito al estimular la expresión del gen que codifica a la sintasa inducible de ON. Esto pudiera causar que un gran número de microsporidios sean fagocitados y eliminados creándose así un efecto sinérgico al utilizar en conjunto estos tratamientos.

Los resultados de este trabajo contrastan con el estudio de Didier (1995) en el hecho de que la adición de LPS a 10ng/ml no consigue incrementar la internalización de microorganismos respecto al tratamiento control (sin previa activación) pero sí con la concentración utilizada en este trabajo (50ng/ml), observándose una diferencia significativa ($P\leq 0.01$) respecto al tratamiento control (MØ + *E.c.*). Sin embargo, existen coincidencias como el hecho de que a las 24 y 48 h la replicación microsporidiana parece inhibirse en células activadas (MØ + LPS + *E.c.*) respecto a células control (MØ + *E.c.*).

Franzen *et al.* (2005) estudiaron el destino que siguen esporas de *E. cuniculi* sobre distintos tipos celulares encontrando que a las 24 h los parásitos aumentan en número, a las 48 h empiezan a disminuir, y para los tres días no se encuentran esporas dentro de macrófagos humanos. Utilizando inmunofluorescencia determinaron el estado intracelular de los microsporidios, encontrando que el número

de esporas internalizadas fue diez veces superior al número de esporoplasmas inyectados. Esto nos hablaría de que la vía de infección predilecta de *E. cuniculi* es a través de la fagocitosis de sus esporas y que el túbulo polar le ayuda más bien a evadir su destrucción dentro de fagolisosomas.

El presente estudio coincide con lo observado por Franzen *et al.* (2005) en el hecho de que a las 48 h se aprecia una disminución en la carga microsporidiana; sin embargo, existe discrepancia con el destino de estas esporas a las 72 h y esto tal vez esto se deba a que ellos suplementaron el medio de cultivo con suero humano autólogo, el cual puede contener una combinación de citocinas como IL-12, IL-6 e inmunoglobulinas como IgM o IgD las cuales pueden contribuir a la eliminación del parásito (Spalter *et al.*, 1999). El incremento en la acidez del medio pudo a su vez influir en la germinación de las esporas y producir la consecuente infección de células vecinas (Williams, 2009).

El trabajo de Franzen *et al.* (2005) podría explicar por qué en este estudio las células con índices fagocíticos más altos también fueron las que presentaron los porcentajes de supervivencia intracelular más altos, ya que al estimular la fagocitosis, se asegura también la infección.

Didier *et al.* (2010) encontraron que la adición de donantes de especies reactivas de nitrógeno sobre macrófagos peritoneales de ratones previamente infectados y estimulados contribuye positivamente a controlar la infección hacia las 72 h. En ese trabajo la adición de L-arginina al 5mM significativamente redujo ($P<0.01$) los niveles de infección en macrófagos sin previa activación ($59.9\% \pm 7.5$) en comparación con las células control no tratadas y no activadas ($100\% \pm 12.83$). Las especies reactivas de nitrógeno al ser productos del ON contribuyen adecuadamente a eliminar los parásitos fagocitados (Tizard, 2013). En el presente trabajo no se agregaron especies reactivas de nitrógeno y los valores de ON no se vieron incrementados al utilizar LPS a 50ng/ml ni al exponer a los macrófagos a esporas de *E. cuniculi*, tal vez por esto los microsporidios no fueron eliminados dentro de los fagolisosomas y escaparon a citoplasma.

La completa inducción en la producción de ON en macrófagos requiere la exposición a citocinas como TNF- α e IFN- γ , las cuales provienen de poblaciones de linfocitos T (Franzen *et al.*, 2005).

La pobre respuesta observada en la producción de ON en los tratamientos de activación (MØ + LPS) de este estudio, podría significar que la concentración de LPS (50ng/ml) es poco estimulante en esta línea celular. Lo anterior coincide con el trabajo de (Meng & Lowell, 1997) donde se demostró que la activación de macrófagos murinos peritoneales con LPS a una concentración de 10ng/ml no consigue incrementar la producción de ON.

En cuanto a la exposición de macrófagos J774A.1 a esporas de *E.cuniculi*, en este trabajo se encontró que estos agentes infecciosos no inducen un aumento en la producción de ON y posiblemente esto se deba a que los microsporidios por su característica de parásitos intracelulares han evolucionado a tal grado de permitir la fagocitosis de sus esporas sin que estas induzcan un aumento en la producción de ON que desencadene la destrucción de las mismas y posterior procesamiento de antígenos. Esto concuerda con el trabajo de Franzen *et al.* (2005) en el que no se observó diferencia significativa en la concentración de nitritos de macrófagos humanos cuando estos fueron expuestos a diferentes especies de microsporidios.

La diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre las 3 y 72 h de los tratamientos de activación (MØ + LPS) e infección (MØ + *E.c.*) puede deberse a la posterior interacción intercelular mediada por citosinas (IL-6, IL-10 y TNF- α), las cuales son producto de la exposición a moléculas extrañas como LPS o glicoproteínas de esporas de *E. cuniculi* (Fischer *et al.*, 2008).

Didier (1995) observó que la producción de nitritos en macrófagos murinos peritoneales no se ve aumentada al utilizar LPS a una concentración de 10ng/ml ni al desafiar a las células únicamente con *E. cuniculi*. Es al utilizar IFN- γ solo o en combinación con LPS y en concentraciones de 10 a 100 μ g/ml cuando los niveles de nitritos se ven aumentados y se presentan diferencias significativas. Podría concluirse que lo encontrado en este trabajo corrobora en parte esos hallazgos ya que la utilización de LPS a 50ng/ml y la exposición a esporas de *E. cuniculi* no consiguieron inducir un aumento en la producción de ON en prácticamente todo el experimento.

Leiro *et al.* (2001) analizaron el estallido respiratorio en macrófagos de rata desafiados con esporas de *M. caulleryi*, encontrando que a las 48 h la producción de nitritos fue significativamente menor cuando las células fueron desafiadas

únicamente con esporas de este parásito (31 μ M) que cuando se activaron con LPS a una concentración de 100ng/ml (56 μ M) o desafiaron con levaduras *Kluyveromyces lactis* (48 μ M). Los macrófagos activados con LPS (100ng/ml) y que fueron además desafiados con esporas microsporidianas produjeron concentraciones de ON inferiores (30 μ M) a los valores observados en células activadas con LPS (100ng/ml) o desafiadas a levaduras *Kluyveromyces lactis* lo que sugiere una modulación en la producción de ON por parte del microsporidio. En el presente estudio podría estarse presentando una modulación de este tipo ya que en el tratamiento que involucró células activadas e infectadas (MØ + LPS + *E.c.*) no se encontraron diferencias significativas entre las 3 y 72 h como si sucedió en células activadas (MØ + LPS) o infectadas (MØ + *E.c.*). Como ya se mencionó en este trabajo, la adición de LPS a una concentración de 50ng/ml consigue incrementar el índice fagocítico y una explicación al posible efecto sinérgico entre el LPS y las esporas de *E. cuniculi* para no disparar los niveles de ON pudiera ser que al estarse garantizando la internalización de las esporas mediante la activación celular, esto a su vez esté favoreciendo que estas puedan modular la producción de ON.

Los ensayos de viabilidad celular son útiles para determinar las concentraciones idóneas de sustancias para ser utilizadas sobre un cultivo celular. Sirven además como un control necesario a la hora de probar tratamientos antimicrobianos o anticancerígenos. Aplicando el mismo fundamento de viabilidad celular, esta técnica puede utilizarse para evaluar que tan patógeno es un microorganismo sobre una línea celular específica.

Los porcentajes de viabilidad en todos los tratamientos se mantuvieron muy cercanos al porcentaje del tratamiento control o incluso lo superaron sin ser esto estadísticamente significativo. La evaluación de la viabilidad celular no solo sirvió para estudiar el posible efecto apoptótico o citotóxico de la adición de esporas de *E. cuniculi* sobre macrófagos murinos peritoneales de ratón sino también para evaluar si a través del tiempo estos parásitos son capaces de alterar la proliferación celular.

Del Aguila *et al.* (2006) observaron que *E. cuniculi* es capaz de inhibir la apoptosis en células Vero E6, algo que también se ha observado con el microsporidio *Nosema algerae* cuando infecta fibroblastos pulmonares humanos (Leech *et al.*, 1999). Lo encontrado en este trabajo podría sustentar esas observaciones ya que

independientemente de la replicación microsporidiana que pudiera existir en los macrófagos J774A.1, estos sobreviven bajo infección por lo menos hasta 72 h.

La diferencia significativa entre las 3 y 72 h pudiera asociarse a metabolismo mitocondrial aumentado y no a proliferación celular. Esto se deduce en base a lo observado por Scanlon *et al.* (2000) quienes demostraron que estos microorganismos son capaces de inhibir la mitosis celular normal de células Vero E6. El aumento en la producción de cristales de formazán puede ser un indicativo de que una vez establecida la infección, estos parásitos pudieran estar forzando al metabolismo mitocondrial de la célula hospedadora para su propio beneficio (Rönnebäumer *et al.*, 2008).

10.- CONCLUSIONES

- La temperatura es un factor determinante en la exposición de estructuras antigénicas cruciales para la presentación y procesamiento antigénico de *E. cuniculi*.
- El método de activación celular aquí expuesto no compromete el índice fagocítico en esporas tratadas con formalina al 10% por lo que se concluye que este factor no es determinante.
- La activación celular con LPS a una concentración de 50ng/ml produce un aumento en el número de microorganismos ingeridos.
- Esa misma activación produce una disminución en el número de microorganismos hacia las 48 h, pero no se consigue eliminar la infección y a las 72 h aumentan considerablemente aprovechando el metabolismo celular y beneficiándose de la activación celular.
- *E. cuniculi* no induce un aumento en la producción de ON en fases tempranas de la infección y este mecanismo de control resulta ser insuficiente.
- La viabilidad celular de macrófagos peritoneales de ratón no se ve comprometida al desafiarlos con esporas de *E. cuniculi* por lo menos hasta las 72 h de infección.

11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*: Elsevier Health Sciences.
- Abu-Akkada, S. S., El Kerdany, E. D. H., Mady, R. F., Diab, R. G., Khedr, G. A. E., Ashmawy, K. I., & Lotfy, W. M. (2015). Encephalitozoon cuniculi infection among immunocompromised and immunocompetent humans in Egypt. *Iranian Journal of Parasitology*, 10(4), 561-570.
- Adam, J., Valenčáková, A., Halánová, M., Danišová, O., Gorbarová, K., & Čisláková, L. (2014). Serological screening of selected microsporidia in HPV-positive women. *Acta Parasitologica*, 60(1), 50-53.
- Ambrosioni, J., van Delden, C., Krause, K. H., Bouchuiguir-Wafa, C., Nagy, M., Passweg, J., & Chalandon, Y. (2010). Invasive microsporidiosis in allogeneic haematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant*, 45(7), 1249-1251.
- Ashmawy, K. I., Abuakkada, S. S., & Awad, A. M. (2011). Seroprevalence of antibodies to Encephalitozoon cuniculi and Toxoplasma gondii in farmed domestic rabbits in Egypt. *Zoonoses and public health*, 58(5), 357-364.
- Baldotto, S. B., Cray, C., Giannico, A. T., Reifur, L., & Montiani-Ferreira, F. (2015). Seroprevalence of Encephalitozoon cuniculi infection in pet rabbits in Brazil. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 24(4), 435-440.
- Biderre, C., Pagès, M., Méténier, G., Canning, E. U., & Christian, V. P. (1995). Evidence for the smallest nuclear genome (2.9 Mb) in the microsporidium Encephalitozoon cuniculi. *Molecular and biochemical parasitology*, 74(2), 229-231.
- Cali, A., & Takvorian, P. M. (1999). Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In *The microsporidia and microsporidiosis* (pp. 85-128): American Society of Microbiology.
- Castillo-Velázquez, U., Aranday-Cortés, E., & Gutiérrez-Pabello, J. A. (2011). Alternative activation modifies macrophage resistance to Mycobacterium bovis. *Veterinary microbiology*, 151(1), 51-59.
- Corradi, N., & Keeling, P. J. (2009). Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biology Reviews*, 23(1-2), 1-8.
- Couzinet, S., Cejas, E., Schittny, J., Deplazes, P., Weber, R., & Zimmerli, S. (2000). Phagocytic uptake of Encephalitozoon cuniculi by nonprofessional phagocytes. *Infection and immunity*, 68(12), 6939-6945.
- Cox, J. C., Hamilton, R. C., & Attwood, H. D. (1979). An investigation of the route and progression of Encephalitozoon cuniculi infection in adult rabbits. *The Journal of Protozoology*, 26(2), 260-265.
- Cray, C., Arcia, G., Schneider, R., Kelleher, S. A., & Arheart, K. L. (2009). Evaluation of the usefulness of an ELISA and protein electrophoresis in the diagnosis of Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. *American journal of veterinary research*, 70(4), 478-482.
- Dall, D. J. (1983). A theory for the mechanism of polar filament extrusion in the Microspora. *Journal of theoretical biology*, 105(4), 647-659.
- De Groote, M. A., Visvesvara, G., Wilson, M. L., Pieniazek, N. J., Slemenda, S. B., Leitch, G. J., . . . Reves, R. (1995). Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated Encephalitozoon cuniculi in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *Journal of Infectious Diseases*, 171(5), 1375-1378.
- del Aguila, C., Izquierdo, F., Granja, A. G., Hurtado, C., Fenoy, S., Fresno, M., & Revilla, Y. (2006). Encephalitozoon microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. *International Journal for Parasitology*, 36(8), 869-876.

- del Aguila, C., Moura, H., Fenoy, S., Navajas, R., Lopez-Velez, R., Li, L., . . . Visvesvara, G. S. (2001). In Vitro Culture, Ultrastructure, Antigenic, and Molecular Characterization of *Encephalitozoon cuniculi* Isolated from Urine and Sputum Samples from a Spanish Patient with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(3), 1105-1108. doi:10.1128/JCM.39.3.1105-1108.2001
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, 89(2), 271-277.
- Desportes-Livage, I. (2000). Biology of microsporidia. In *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis* (Vol. 6, pp. 140-165): Karger Publishers.
- Didier, & Elizabeth. (1995). Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum microspora) replication in murine peritoneal macrophages. In (pp. 405-412). Department of Microbiology, Tulane Regional Primate Research Center, 18703 Three Rivers Road, Covington, LA 70433, USA: Blackwell Science.
- Didier, E. S. (2005). Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica*, 94(1), 61-76.
- Didier, E. S., Bowers, L. C., Martin, A. D., Kuroda, M. J., Khan, I. A., & Didier, P. J. (2010). Reactive nitrogen and oxygen species, and iron sequestration contribute to macrophage-mediated control of *Encephalitozoon cuniculi* (Phylum Microsporidia) infection in vitro and in vivo. *Microbes and Infection*, 12(14-15), 1244-1251.
- Didier, E. S., Snowden, K. F., & Shadduck, J. A. (1998). Biology of Microsporidian Species Infecting Mammals. In S. Tzipori (Ed.), *Advances in Parasitology* (Vol. Volume 40, pp. 283-320): Academic Press.
- Didier, E. S., Visvesvara, G. S., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C., De Groote, M. A., & Vossbrinck, C. R. (1996). A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(11), 2835-2837.
- Didier, E. S., Vossbrinck, C. R., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C., & Shadduck, J. A. (1995). Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology*, 111(04), 411-421.
- Dill, K. A., & Shortle, D. (1991). Denatured states of proteins. *Annual review of biochemistry*, 60(1), 795-825.
- Fasshauer, V., Gross, U., & Bohne, W. (2005). The parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* lacks host cell membrane proteins immediately after invasion. *Eukaryotic cell*, 4(1), 221-224.
- Fischer, J., Suire, C., & Hale-Donze, H. (2008). Toll-like receptor 2 recognition of the microsporidia *Encephalitozoon* spp. induces nuclear translocation of NF- κ B and subsequent inflammatory responses. *Infection and immunity*, 76(10), 4737-4744.
- Franzen, C. (2004). Microsporidia: how can they invade other cells? *Trends in Parasitology*, 20(6), 275-279.
- Franzen, C., Hartmann, P., & Salzberger, B. (2005). Cytokine and nitric oxide responses of monocyte-derived human macrophages to microsporidian spores. *Experimental parasitology*, 109(1), 1-6.
- Franzen, C., Müller, A., Hartmann, P., & Salzberger, B. (2005). Cell invasion and intracellular fate of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). *Parasitology*, 130(03), 285-292.
- Franzen, C., Schwartz, D. A., Visvesvara, G. S., Müller, A., Schwenk, A., Salzberger, B., . . . Diehl, V. (1995). Immunologically confirmed disseminated, asymptomatic *Encephalitozoon cuniculi* infection of the gastrointestinal tract in a patient with AIDS. *Clinical infectious diseases*, 21(6), 1480-1484.
- Frixione, E., Ruiz, L., Cerbon, J., & Undeen, A. H. (1997). Germination of *Nosema algerae* (Microspora) spores: conditional inhibition by D2O, ethanol and Hg²⁺ suggests

- dependence of water influx upon membrane hydration and specific transmembrane pathways. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44(2), 109-116.
- Frixione, E., Ruiz, L., Santillán, M., de Vargas, L. V., Tejero, J. M., & Undeen, A. H. (1992). Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell motility and the cytoskeleton*, 22(1), 38-50.
- Fuentes. (2013). Hemocytometer protocol – filling sheet. Retrieved from <http://www.hemocytometer.org/2013/06/06/hemocytometer-protocol-filling-sheet/>
- Green, L. C., LeBlanc, P. J., & Didier, E. S. (2000). Discrimination between viable and dead *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidian) spores by dual staining with Sytox Green and Calcofluor White M2R. *Journal of clinical microbiology*, 38(10), 3811-3814.
- Griess, P. (1879). Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“ □. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 12(1), 426-428.
- Halánová, M., Cislakova, L., Valencakova, A., Balent, P., Adam, J., & Travnicek, M. (2002). Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, 10(1), 117-120.
- Harcourt-Brown, F. M. (2004). *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 13(2), 86-93.
- Heussler, V. T., Küenzi, P., & Rottenberg, S. (2001). Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *International Journal for Parasitology*, 31(11), 1166-1176.
- Igarashi, M., Oohashi, E., Dautu, G., Ueno, A., Kariya, T., & Furuya, K. (2008). High seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(12), 1301-1304.
- Ishihara, R. (1968). Some observations on the fine structure of sporoplasm discharged from spores of a microsporidian, *Nosema bombycis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 12(3), 245-258.
- láñez. (1999). Curso de Inmunología general. 4. antígenos.
- Jeklova, E., Jekl, V., Kovarcik, K., Hauptman, K., Koudela, B., Neumayerova, H., . . . Faldyna, M. (2010). Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary parasitology*, 170(1), 143-148.
- John, D. E., Haas, C. N., Nwachuku, N., & Gerba, C. P. (2005). Chlorine and ozone disinfection of *Encephalitozoon intestinalis* spores. *Water research*, 39(11), 2369-2375.
- Joseph, J., & Sharma, S. (2009). *<i>In vitro</i> culture of various species of microsporidia causing keratitis: Evaluation of three immortalized cell lines* (Vol. 27).
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., . . . Wincker, P. (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414(6862), 450-453.
- Keeling, P. J. (2003). Congruent evidence from α -tubulin and β -tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genetics and Biology*, 38(3), 298-309.
- Keeling, P. J., & Fast, N. M. (2002). Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 93-116.
- Keoghane, E. M., & Weiss, L. M. (1999). The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. In *The microsporidia and microsporidiosis* (pp. 196-224): American Society of Microbiology.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239.

- Künzel, F., Gruber, A., Tichy, A., Edelhofer, R., Nell, B., Hassan, J., . . . Joachim, A. (2008). Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, 151(2–4), 115-124.
- Ladapo, T. A., Nourse, P., Pillay, K., Freat, J., Birkhead, M., Poonsamy, B., & Gajjar, P. (2014). Microsporidiosis in pediatric renal transplant patients in Cape Town, South Africa: two case reports. *Pediatric transplantation*, 18(7), E220-E226.
- Leech, M. S. J. G. J., Shaw, A. P., Moura, H., & Visvesvara, G. S. (1999). Susceptibility to apoptosis is reduced in the microsporidia-infected host cell. *J. Eukaryot. Microbiol*, 46(5).
- Leiro, J., Iglesias, R., Paramá, A., Sanmartín, M. L., & Ubeira, F. M. (2001). Respiratory burst responses of rat macrophages to microsporidian spores. *Experimental parasitology*, 98(1), 1-9.
- Leiro, J., Ortega, M., Estévez, J., Ubeira, F. M., & Sanmartín, M. L. (1996). The role of opsonization by antibody and complement in in vitro phagocytosis of microsporidian parasites by turbot spleen cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 51(1), 201-210.
- Leiro, J., Ortega, M., Sanmartín, M. L., & Ubeira, F. M. (2000). Non-specific responses of Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) adherent cells to microsporidian spores. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 75(1–2), 81-95.
- Leiro, J., Ortega, M., Siso, M. I. G., Sanmartín, M. L., & Ubeira, F. M. (1997). Effects of chitinolytic and proteolytic enzymes on in vitro phagocytosis of microsporidians by spleen macrophages of turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Veterinary immunology and immunopathology*, 59(1), 171-180.
- Leiro, J., Siso, M. I. G., Ortega, M., Santamarina, M. T., & Sanmartín, M. L. (1995). A factorial experimental design for investigation of the effects of temperature, incubation time, and pathogen-to-phagocyte ratio on in vitro phagocytosis by turbot adherent cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 112(2), 215-220.
- Leiro, J. M., Piazzon, C., Domínguez, B., Mallo, N., & Lamas, J. (2012). Evaluation of some physical and chemical treatments for inactivating microsporidian spores isolated from fish. *International journal of food microbiology*, 156(2), 152-160.
- Leitch, G. J., Visvesvara, G. S., & He, Q. (1993). Inhibition of microsporidian spore germination. *Parasitology Today*, 9(11), 422-424.
- Levaditi, C., Nicolau, S., & Schoen, R. (1923). L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (Encephalitozoon cuniculi). *CR Soc. Biol. Paris*, 89, 984-986.
- Lom, J., & Vavra, J. (1963). *The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores*.
- Luft, J. H. (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 9(2), 409.
- MacFarlane, M., & Williams, A. C. (2004). Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO reports*, 5(7), 674-678.
- Mathis, A. (2000). Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *International Journal for Parasitology*, 30(7), 795-804.
- Matsubayashi, H. (1959). A case of Encephalitozoon-like body infection in man. In T. Kioke (Ed.), *Arch Pathol* (Vol. 67, pp. 181–187).
- Medzhitov, R., & Janeway Jr, C. (2000). Innate immunity. *New England Journal of Medicine*, 343(5), 338-344.
- Meng, F., & Lowell, C. A. (1997). Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *Journal of experimental medicine*, 185(9), 1661-1670.
- Meredith, A. L., & Richardson, J. (2015). Neurological Diseases of Rabbits and Rodents. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 24(1), 21-33.

- Mertens, R. B., Didier, E. S., Fishbein, M. C., Bertucci, D. C., Rogers, L. B., & Orenstein, J. M. (1997). Encephalitozoon cuniculi microsporidiosis: infection of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with AIDS. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 10(1), 68-77.
- Mohindra, A. R., Lee, M. W., Visvesvara, G., Moura, H., Parasuraman, R., Leitch, G. J., . . . Del Busto, R. (2002). Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient. *Transplant infectious disease*, 4(2), 102-107.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Méténier, G., & Vivarès, C. P. (2001). Molecular characteristics and physiology of microsporidia. *Microbes and infection*, 3(5), 407-415.
- Narnaware, Y. K., Baker, B. I., & Tomlinson, M. G. (1994). The effect of various stresses, corticosteroids and adrenergic agents on phagocytosis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 13(1), 31-40.
- Niederkorn, J. Y., & Shadduck, J. A. (1980). Role of antibody and complement in the control of Encephalitozoon cuniculi infections by rabbit macrophages. *Infection and Immunity*, 27(3), 995-1002.
- Ohshima, K. (1937). On the function of the polar filament of *Nosema bombycis*. *Parasitology*, 29(02), 220-224.
- Okewole, E. A. (2008). Seroprevalence of antibodies to Encephalitozoon cuniculi in domestic rabbits in Nigeria. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 75(1), 33-38.
- Pacheco, Manuel, & Megías. (2016). Técnicas histológicas. Fijadores. Retrieved from <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/2-fijadores.php>
- Peuvel-Fanget, I., Polonais, V., Brosseau, D., Texier, C., Kuhn, L., Peyret, P., . . . Delbac, F. (2006). EnP1 and EnP2, two proteins associated with the Encephalitozoon cuniculi endospore, the chitin-rich inner layer of the microsporidian spore wall. *International journal for parasitology*, 36(3), 309-318.
- Rojas-Espinosa, O., & Arce-Paredes, P. (2003). Fagocitosis: mecanismos y consecuencias Primera parte. *Bioquímica*, 28(4), 19-30.
- Rossi, P., La Rosa, G., Ludovisi, A., Tamburrini, A., Gomez Morales, M. A., & Pozio, E. (1998). Identification of a human isolate of Encephalitozoon cuniculi type I from Italy. *International Journal for Parasitology*, 28(9), 1361-1366.
- Rönnebömer, K., Gross, U., & Böhne, W. (2008). The nascent parasitophorous vacuole membrane of Encephalitozoon cuniculi is formed by host cell lipids and contains pores which allow nutrient uptake. *Eukaryotic cell*, 7(6), 1001-1008.
- S Nasonova, E., Tokarev, Y. S., Trammer, T., Entzeroth, R., & Sokolova, Y. Y. (2001). Phagocytosis of *Nosema grylli* (Microsporidia, Nosematidae) spores in vivo and in vitro. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(s1).
- Salát, J., Braunfuchsová, P., Kopecký, J., & Ditrich, O. (2002). Role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in the protection of mice against Encephalitozoon intestinalis infection. *Parasitology Research*, 88(7), 603-608. doi:10.1007/s00436-002-0620-9
- Santaniello, A., Dipineto, L., Rinaldi, L., Menna, L. F., Cringoli, G., & Fioretti, A. (2009). Serological survey of Encephalitozoon cuniculi in farm rabbits in Italy. *Research in Veterinary Science*, 87(1), 67-69.
- Scanlon, M., Shaw, A. P., Zhou, C. J., Visvesvara, G. S., & Leitch, G. J. (2000). Infection by microsporidia disrupts the host cell cycle. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(6), 525-531.

- Spalter, S. H., Kaveri, S. V., Bonnin, E., Mani, J.-C., Cartron, J.-P., & Kazatchkine, M. D. (1999). Normal human serum contains natural antibodies reactive with autologous ABO blood group antigens. *Blood*, 93(12), 4418-4424.
- Tanford, C. (1968). Protein denaturation. *Advances in protein chemistry*, 23, 121-282.
- Tee, K.-Y., Kao, J.-P., Chiu, H.-Y., Chang, M.-H., Wang, J.-H., Tung, K.-C., . . . Wu, J.-T. (2011). Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Taiwan. *Veterinary parasitology*, 183(1), 68-71.
- Thelohan, P. (1894). Sur la presence d'une capsule a filament dans les spores des microsporidies. *CR Acad. Sci*, 118, 1425-1427.
- Tizard, I. R. (2013). *Veterinary immunology*: Elsevier Health Sciences.
- Tosoni, A., Nebuloni, M., Ferri, A., Bonetto, S., Antinori, S., Scaglia, M., . . . Vago, L. (2002). Disseminated microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* III (dog type) in an Italian AIDS patient: a retrospective study. *Modern pathology*, 15(5), 577-583.
- Undeen, A. H. (1990). A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. *Journal of Theoretical Biology*, 142(2), 223-235.
- Undeen, A. H., & Vander Meer, R. K. (1999). Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *Journal of invertebrate pathology*, 73(3), 294-302.
- Valencakova, A., & Halanova, M. (2012). Immune response to *Encephalitozoon* infection review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(1), 1-7.
- Visvesvara, G. S. (2002). In Vitro Cultivation of Microsporidia of Clinical Importance. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 401-413. doi:10.1128/CMR.15.3.401-413.2002
- Vossbrinck, C. R., & Woese, C. R. (1986). Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8 S RNA.
- Vávra, J. (1976). Structure of the microsporidia. In *Biology of the Microsporidia* (pp. 1-84): Springer.
- Vávra, J. (2005). Polar vesicles" of microsporidia are mitochondrial remnants ("mitosomes"). *Folia Parasitol*, 52(1/2), 193-195.
- Waller, T. (1979). Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. *Laboratory animals*, 13(3), 227-230.
- Wang, H., Wang, F., Tao, X., & Cheng, H. (2012). Ammonia-containing dimethyl sulfoxide: An improved solvent for the dissolution of formazan crystals in the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. *Analytical Biochemistry*, 421(1), 324-326.
- Weber, R., Bryan, R. T., Schwartz, D. A., & Owen, R. L. (1994). Human microsporidian infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), 426-461.
- Weber, R., Deplazes, P., Flepp, M., Mathis, A., Baumann, R., Sauer, B., . . . Lüthy, R. (1997). Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine*, 336(7), 474-478.
- Weidner, E. (1975). Interactions between *Encephalitozoon cuniculi* and macrophages. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 47(1), 1-9.
- Weidner, E., & Byrd, W. (1982). The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge. *The Journal of cell biology*, 93(3), 970-975.
- Weiss, L. M., & Becnel, J. J. (2014). *Microsporidia: pathogens of opportunity*: John Wiley & Sons.
- Weiss, L. M., & Vossbrinck, C. R. (1999). Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia. In *The microsporidia and microsporidiosis* (pp. 129-171): American Society of Microbiology.
- Williams, B. A. P. (2009). Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cellular microbiology*, 11(11), 1551-1560.
- Williams, B. A. P., Hirt, R. P., Lucocq, J. M., & Embley, T. M. (2002). A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature*, 418(6900), 865-869.

- Wright, J. H., & Craighead, E. M. (1992). Infectious motor paralysis in young rabbit. *J Exp Med*, 36, 135-140.
- Yaoqian, P. A. N., Shuai, W., Xingyou, L. I. U., Ruizhen, L. I., & Yuqian, S. U. N. (2015). Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Humans and Rabbits in China. *Iranian journal of parasitology*, 10(2), 290.

12.- SOLUCIONES

RPMI 1640 con SFBI

Polvo	14.6	g
Antibiótico/Antimicótico	11	ml
Bicarbonato de Sodio	2	g
SFBI	50	ml
Agua destilada estéril	950	ml

*Filtrar con poro de 0.22µm

DMEM sin SFBI

Polvo	8.3	g
Glucosa	1	g
L-glutamina	0.584	g
Bicarbonato de Sodio	3.7	g
Antibiótico/Antimicótico	11	ml
Agua destilada estéril	1000	ml

*Filtrar con poro de 0.22µm

PBS 1X

NaCl	8.06	g
KCl	0.22	g
Na ₂ HPO ₄	1.15	g
KH ₂ PO ₄	0.2	g

*Ajustar a pH de 7.5 *Filtrar con poro de 0.22µm

Trypsina 1X al 0.5%

Trypsin – EDTA 10X	10	ml
PBS 1X	90	ml

Tripsina 1X al 0.25%

Tripsina 1X al 0.5%	1	parte
PBS 1X	1	parte

Medio de congelación para células

SFBI	90	ml
DMSO	10	ml
Antibiótico/Antimicótico	1.1	ml

Medio de congelación para esporas

SFBI	6	ml
DMSO	20	ml
RPMI 1640	74	ml

Ácido clorhídrico al 3M

Ácido clorhídrico	9.3	ml
Agua ultra pura	90.7	ml

Sulfanilamida

Sulfanilamida	0.9987	g
Ácido clorhídrico al 3M	100	ml

NED

Dihidrocloreuro de N-1-naftil - etilendiamina	10	g
Agua ultra pura	250	ml

MTT 1mg/ml

MTT	50	mg
PBS	50	ml